

Université de Montréal

# **Régulation transcriptionnelle à très grande distance du gène codant pour le récepteur à la vasopressine de type 2**

par  
Nicolas Debrand

11600979

Département de Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en Sciences Biomédicales

Avril 2004

© Nicolas Debrand, 2004



W

4

U58

2005

V. 020

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation transcriptionnelle à très grande distance du gène codant  
pour le récepteur à la vasopressine de type 2

présenté par :  
Nicolas Debrand

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Alain Bonnardeaux, président-rapporteur  
Dr. Daniel G. Bichet, directeur de recherche  
Dr. John Chan, membre du jury

## Résumé

La régulation précise de l'expression des gènes est indispensable à la production et au maintien de nombreux types cellulaires et tissulaires différents d'un organisme multicellulaire. En conséquence, un gène donné est exprimé dans une cellule donnée durant le développement et durant la différenciation cellulaire. C'est le cas par exemple du gène codant le récepteur de la vasopressine de type 2, l'*AVPR2*, qui est exprimé de manière exclusive dans les cellules principales du tubule collecteur du rein.

Le contrôle de la transcription constitue le premier et principal niveau de la régulation de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes. Dans le génome des eucaryotes, les éléments régulateurs, ou éléments *cis*-régulateurs, peuvent être localisés à de très longue distance du gène exprimé, parfois à plusieurs centaines de paires de bases.

Le laboratoire du Dr. Bichet a identifié une délétion de 8 kb en amont du gène de l'*AVPR2* dans une famille atteinte de diabète insipide néphrogénique (DIN) lié à l'X. Les hommes atteints de diabète insipide néphrogénique dans cette famille, présentent un gène de l'*AVPR2* intact. Dans une seconde famille, six hommes atteints de DIN ont aussi des séquences codantes pour l'*AVPR2* normales, mais présentent une délétion de 102 pb qui se trouve à l'intérieur de la zone précédente de 8 kb. Enfin dans une autre famille présentant les mêmes caractéristiques, une troisième délétion, de 11 kb, a été identifiée dans la même région.

La zone de 102 pb a été clonée en amont de différentes séquences du promoteur de l'*AVPR2*, 4.6 kb et 1.4 kb, et les niveaux d'augmentation de l'expression du gène rapporteur sont, respectivement de 10 et 5 fois dans les cellules du tubule proximal et dans les cellules du tubule collecteur. De plus deux courtes séquences régulatrices ont été identifiées à l'intérieur des 102 pb : l'une semble être commune aux cellules du tubule proximal et aux cellules du tubule collecteur et une seconde paraît être spécifique aux cellules du tubule collecteur.

Ces résultats préliminaires doivent conduire à une meilleure compréhension de la régulation de la transcription de l'*AVPR2* chez l'homme. Au final, l'identification d'une séquence capable d'induire l'expression adéquate de l'*AVPR2* pourrait déboucher sur un traitement par thérapie génique des patients atteints de DIN.

**Mots-clés :** *AVPR2*, diabète insipide néphrogénique lié à l'X, séquence régulatrice, thérapie génique, contrôle de la transcription

## Abstract

The primary purpose of gene control in multicellular organisms is the execution of precise development and tissue-specific decisions. As a consequence, the proper genes are expressed in the proper cells during development and differentiation. For example, the *AVPR2* gene, which encodes the vasopressin V2 receptor, is only expressed in the principal cells of the collecting ducts in the kidney. Transcriptional control is the primary means of regulating gene expression in eukaryote cells.

In eukaryotic genomes, *cis*-acting elements that regulate transcription are located at a distance of several thousand base pairs from the gene being expressed. Dr. Bichet's lab has identified a large 8 kb deletion upstream of the *AVPR2* gene in one X-linked nephrogenic diabetes insipidus (NDI) family. This deletion leaves intact the *AVPR2* sequence, yet males bearing this deletion have classical X-linked NDI. In a second X-linked NDI family with 6 affected males bearing a completely normal *AVPR2* coding sequence, a 102bp deletion was recently identified that is located within the 8 kb deletion of the previous family. Finally a third family with an 11 kb deletion shared the same clinical characteristics.

The 102 bp region was cloned 4.6 kb and 1.4 kb upstream of the promoter region of the *AVPR2* gene, and a 4-fold increase in expression vector was observed in proximal tubules cells and a 3-fold in collecting ducts cells. Two short regulatory sequences have been identified within the 102bp: one that is shared by proximal tubule and collecting duct cells, and another that may be specific to the collecting ducts cells.

These preliminary results will lead to a better understanding of the regulation of the *AVPR2* expression in human. The characterization of an optimal expression element capable of efficient expression of *AVPR2* should be useful in the development of gene therapy for X-linked NDI.

**Keywords :** *AVPR2*, gene therapy, regulatory sequence, transcriptional control, X-linked nephrogenic diabetes insipidus



## Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>vii</b>
<b>Abréviations.....</b>	<b>xii</b>
<b>Liste des graphiques.....</b>	<b>xv</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xix</b>

## **Chapitre 1. Physiologie rénale normale et pathologique ..... 1**

<b>1. Physiologie rénale normale et pathologique .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Anatomie et physiologie rénale .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1. Structure du rein .....</b>	<b>2</b>
1.1.1.1. Au niveau macroscopique.....	2
1.1.1.1.1. Le rein .....	2
1.1.1.1.2. La vascularisation rénale.....	2
1.1.1.2. Au niveau microscopique : le néphron.....	3
<b>1.1.2. Fonctions du rein .....</b>	<b>4</b>
1.1.2.1. Fonctions tubulaires .....	5
1.1.2.1.1. Au niveau du tubule proximal.....	5
1.1.2.1.2. Au niveau de l'anse de Henle .....	5
1.1.2.1.3. Au niveau du tubule distal .....	6
1.1.2.1.4. Au niveau du tubule collecteur .....	6

1.1.2.2. Autres fonctions du rein .....	6
<b>1.1.3. Système de drainage de l'urine .....</b>	<b>8</b>
1.1.3.1. Le système de contre-courant.....	9
1.1.3.2. Le recyclage de l'urée .....	11
1.1.3.3. Le système d'échange des vasa recta .....	12
<b>1.1.4. Hormone agissant au niveau rénal : l'hormone antidiurétique .....</b>	<b>13</b>
1.1.4.1. Synthèse et sécrétion de l'AVP .....	13
1.1.4.2. Régulation de la sécrétion de l'AVP .....	15
1.1.4.3. Rôles de l'AVP .....	16
<b>1.1.5. Pathologies liées aux dérèglements des flux hydriques.....</b>	<b>17</b>
1.1.5.1. Désordres dans le métabolisme de l'eau et le contrôle de l'osmolalité .....	17
1.1.5.1.1. Diabète insipides .....	18
1.1.5.1.2. Le syndrome de sécrétion inappropriée d'ADH .....	18
1.1.5.1.3. La polydipsie psychogénique.....	19
1.1.5.2. Désordres dans le métabolisme du sodium .....	19
<b>1.2. Le diabète insipide .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1. Le diabète insipide central.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.2. Le diabète insipide néphrogénique .....</b>	<b>20</b>
1.2.2.1. DIN primaire ou héréditaire .....	20
1.2.2.1.1. Rôle de l'AVPR2 .....	21
1.2.2.1.2. Rôle des aquaporines (AQPs) .....	22
1.2.2.1.3. Syndrome de Bartter .....	23
1.2.2.2. DIN secondaire ou acquis .....	25
1.2.2.2.1. L'insuffisance rénale chronique ou IRN.....	25

1.2.2.2.2. DIN et médicaments.....	26
1.2.2.2.3. Hypercalcémie ou hypokaliémie.....	26

## **Chapitre 2. Les récepteurs de la vasopressine et le diabète insipide néphrogénique.....28**

<b>2. Les récepteurs de la vasopressine et DIN.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Les types de récepteurs.....</b>	<b>29</b>
2.1.1. Classe de protéine.....	30
2.1.2. Localisation et voie de signalisation.....	31
2.1.2.1. Les récepteurs V1a.....	31
2.1.2.2. Les récepteurs V1b.....	32
2.1.2.3. Les récepteurs de l'ocytocine.....	32
<b>2.2. Les récepteurs à la vasopressine de type2 : Les AVPR2 .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.1. Généralités des AVPR2.....</b>	<b>33</b>
2.2.1.1. Classe de protéine .....	33
2.2.1.2. Voie de signalisation.....	34
<b>2.2.2. Analyse moléculaire de l'AVPR2 .....</b>	<b>36</b>
2.2.2.1. DIN par mutation de l'AVPR2 .....	36
2.2.2.2. AVPR2 normal et DIN lié à l'X.....	37
2.2.2.3. Le promoteur de l'AVPR2.....	38

<b>Chapitre 3. La transcription chez les eucaryotes .....</b>	<b>40</b>
<b>3. La transcription chez les eucaryotes.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Les gènes eucaryotes .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1.1. Types de gènes et de polymérases .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1.2. Structure d'un gène classe II.....</b>	<b>43</b>
3.1.2.1. La région promotrice ou promoteur proximal.....	43
3.1.2.2. Les régions régulatrices.....	44
<b>3.2. La transcription d'un gène de classe II .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.1. L'initiation .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.2. L'élongation, la terminaison et la maturation du messenger.....</b>	<b>48</b>
<b>Chapitre 4. Matériels et méthodes .....</b>	<b>51</b>
<b>4. Matériels et méthodes .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1. Lignées et culture cellulaires .....</b>	<b>52</b>
4.1.2. Cellules du tubule proximal .....	53
4.1.2. Cellules du tubule collecteur .....	53
4.1.3. Lignée témoin .....	54
4.1.4. Culture cellulaire.....	54
<b>4.2. Constructions.....</b>	<b>55</b>
4.2.1. Constructions pour étudier l'effet de l'élément distal.....	55
4.2.2. Constructions visant à localiser une zone spécifique dans l'élément distal ...	58
<b>4.3. Expériences de transfections transitoires.....</b>	<b>59</b>

<b>Chapitre 5. Résultats et discussion .....</b>	<b>61</b>
<b>5. Résultats et discussion .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1. Effet de l'élément distal .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1.1. Effet de l'élément distal dans les cellules du tubule collecteur (V47) .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1.2. Comparaison de l'effet de l'élément distal dans les cellules du tubule collecteur (V47) et les cellules du tubule proximal (V11) .....</b>	<b>65</b>
<b>5.2. Étude détaillée de l'élément distal .....</b>	<b>67</b>
<b>5.2.1. Étude des mutations DE2m à DE4m .....</b>	<b>68</b>
<b>5.2.2. Étude des mutations DE5m à DE7m .....</b>	<b>71</b>
<b>5.2.3. Étude des mutations DE8m à DE10m .....</b>	<b>72</b>
<b>5.2.4. Étude des mutations DE11m à DE13m .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2.5. Étude des mutations DE2m, DE3m et DE14m .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.6. Récapitulatifs des résultats obtenus dans les trois lignées cellulaires .....</b>	<b>76</b>
5.2.6.1. Récapitulatif dans les cellules du tubule collecteur (V47) .....	77
5.2.6.1. Récapitulatif dans les cellules du tubule proximal (V11) .....	79
5.2.6.1. Récapitulatif dans les fibroblastes (10T1/2) .....	81
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>83</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>I</b>

## Abréviations

**10T1/2** : Fibroblastes de lignée C<sub>3</sub>H 10T1/2

**Ang II** : Angiotensine II

**ACTH** : Hormone adrénocorticotrope

**ADA** : Adenosine deaminase (adénosine désaminase)

**ADH** : Antidiuretic hormone (hormone antidiurétique ou **AVP**)

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique

**AQP2** : Aquaporine de type 2

**AQP2** : Gène codant l'AQP2

**AQP** : Aquaporine

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ARN pol** : Acide ribonucléique polymérase (I, II et III)

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomal

**ARNt** : Acide ribonucléique de transfert

**ATP** : Adénosine triphosphate

**AV3V** : Région antéro-ventrale du troisième ventricule

**AVP** : L-arginine vasopressine

**AVPR1a** : Récepteur de la vasopressine vasculaire (**V1a**)

**AVPR1b** : Récepteur de la vasopressine pituitaire (**V1b** ou **V3**)

**AVPR2** : Récepteur 2 de l'arginine vasopressine

**AVPR2** : Gène codant le récepteur AVPR2

**BRE** : TFIIB recognition element (élément de reconnaissance du facteur de transcription B)

**CFTR** : Cystic fibrosis transmembrane conductance receptor

**CIE1** : Collecting duct inhibitory element 1

**CPI** : Complexe de pré-initiation

**CPSF** : Cleavage and polyadenylation specific factor (facteur spécifique du clivage et de la polyadénylation)

**CSE1** : Collecting duct stimulatory element 1

**dDAVP** : 1-desamino[8-D-arginine] vasopressine

**DAG** : Diacylglycérol

**DE** : Distal element (élément distal)

**DIN** : Diabète insipide néphrogénique

**DMEM** : Dulbecco's modified Eagle's medium

**DPE** : Downstream core promoter element (élément aval du cœur du promoteur)

**ECA** : Enzyme de conversion de l'angiotensine II

**FT** : Facteur de transcription

**GTP** : Guanosine triphosphate

**Inr** : Initiator (élément initiateur)

**IP3** : Inositol 1, 4, 5-triphosphate

**IRN** : Insuffisance rénale chronique

**kb** : Kilobase (1000 paires de bases)

**kg** : Kilogramme

**l** : Litre

**LCR** : Locus control region (région de contrôle du locus)

**Mb** : Mégabase (1 000 000 paires de bases)

**ml** : Millilitre

**mOsm** : Milliosmole

**m.p** : Minimal promoter

**NaCl** : Chlorure de sodium

**ng** : Nanogramme

**nm** : Nanomètre

**NPII** : Neurophysine II

**pb** : Paire de bases

**PBS** : Phosphate buffer solution

**PCR** : Polymerase chain reaction (ou réaction de polymérisation en chaîne)

**PKA** : Protéine kinase A

**PLC** : Phospholipase C

**Pré-ARNm** : Précurseur de l'acide ribonucléique messenger ou ARNm primaire

**Protéine G** : Protéine régulatrice de guanine

**PTH** : parathyroid hormone (hormone parathyroïdienne)

**RAS** : Renin-angiotensin system (système rénine-angiotensine)

**RCPG** : Récepteur couplé aux protéines G

**RC.SV1** : Cellules rénales à caractéristiques du tubule proximal (ou **V11**)

**RC.SVtsA58** : Cellules rénales à caractéristiques du tubule collecteur (ou **V47**)

**ROT** : Récepteur à l'ocytocine

**Sn RNA** : Small nuclear ribonucleic acid (petit acide ribonucléique nucléaire)

**SV 40** : Virus simien 40

**SVF** : Sérum de veau foetal

**TAF** : TBP-associated factor (facteur associé à la TBP)

**TBP** : TATA box-binding protein (protéine liant la boîte TATA)

**TFIIA** : Transcription factor A for polymerase II (facteur de transcription A pour la pol II)

**TGF-  $\beta$ 1** : Transforming growth factor- $\beta$ 1 (facteur de croissance transformant- $\beta$ 1)

**UT1** : Transporteur d'urée 1

**Xq28** : Locus 28 du bras long du chromosome X



## Liste des graphiques

<b>Graphique 1</b>	Effet du DE dans les cellules V47
<b>Graphique 2</b>	Comparaison de l'effet du DE dans les cellules V47 et les cellules V11
<b>Graphique 3</b>	Effet des mutations DE2m, DE3m et DE4m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires
<b>Graphique 4</b>	Effet des mutations DE2m, DE3m et DE4m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires
<b>Graphique 5</b>	Effet des mutations DE5m, DE6m et DE7m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires
<b>Graphique 6</b>	Effet des mutations DE8m, DE9m et DE10m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires
<b>Graphique 7</b>	Effet des mutations DE11m, DE12m et DE13m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires
<b>Graphique 8</b>	Effet des mutations DE2m, DE3m et DE14m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires
<b>Graphique 9</b>	Effet des 13 séries de mutations sur l'expression du gène rapporteur par rapport au contrôle 1.4DE dans les cellules V47
<b>Graphique 10</b>	Effet des 13 séries de mutations sur l'expression du gène rapporteur par rapport au contrôle 1.4DE dans les cellules V11

**Graphique 11**      Effet des 13 séries de mutations sur l'expression du gène rapporteur par rapport au contrôle 1.4DE dans les cellules 10T1/2

## Liste des figures

- Figure 1** Représentation schématique d'un rein et d'un néphron
- Figure 2** Le mécanisme de concentration de l'urine
- Figure 3** Le transport des UT1 à la membrane luminale
- Figure 4** Le mécanisme de recyclage de l'urée
- Figure 5** Les vasa recta
- Figure 6** La synthèse de la vasopressine
- Figure 7** La structure de la vasopressine
- Figure 8** Représentation schématique de l'expression membranaire des AQP2
- Figure 9** Réabsorption du sodium dans la branche ascendante de l'anse de Henle
- Figure 10** Les récepteurs couplés aux protéines G
- Figure 11** Représentation schématique du récepteur V2 humain de la vasopressine
- Figure 12** Représentation schématique de la cascade intracellulaire conduisant à l'expression membranaire des AQP2 suite à la liaison de l'AVP
- Figure 13** Représentation schématique des délétions en amont de l'*AVPR2*
- Figure 14** Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle de l'*AVPR2*
- Figure 15** Structure d'un gène de classe II
- Figure 16** Activation à distance des gènes par une séquence activatrice
- Figure 17** La machinerie transcriptionnelle eucaryote
- Figure 18** Représentation schématique du rôle des activateurs
- Figure 19** Représentation schématique des fragments utilisés dans l'étude de l'expression de l'*AVPR2*
- Figure 20** Représentation schématique des différentes constructions clonées dans le vecteur d'expression
- Figure 21** Série de mutations à l'intérieur du DE
- Figure 22** Exemple de mutations affectant la zone 6 du DE
- Figure 23** Série de mutations à l'intérieur du DE

- Figure 24** Mutations DE2m, DE3m et DE4m à l'intérieur du DE
- Figure 25** Mutations DE5m, DE6m et DE7m à l'intérieur du DE
- Figure 26** Mutations DE8m, DE9m et DE10m à l'intérieur du DE
- Figure 27** Mutations DE11m, DE12m et DE13m à l'intérieur du DE
- Figure 28** Mutations DE2m, DE3m et DE14m à l'intérieur du DE
- Figure 29** Série de mutations à l'intérieur du DE
- Figure 30** Série de mutations à l'intérieur du DE
- Figure 31** Série de mutations à l'intérieur du DE

## Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr. Bichet de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de travailler dans un domaine aussi vaste qu'intéressant, la régulation transcriptionnelle des gènes.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux Drs. Rossert et Ribes de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris (France) pour leur étroite collaboration et pour m'avoir fourni les protocoles et les techniques nécessaires au bon déroulement de ce projet.

Je remercie également Nicole Ruel sans qui l'ensemble des manipulations entourant la culture cellulaire et les mesures d'expression n'auraient eu lieu.

J'associe à ces remerciements Cécile pour sa gentillesse, sa disponibilité et son soutien et sans qui les manipulations et la rédaction de ce mémoire n'auraient pu se faire.

Je suis reconnaissant à Marie-Françoise Arthus et Michèle Lonergan de m'avoir fait partager leurs connaissances des techniques de PCR et de constructions. Enfin, je remercie Danielle Binette pour ses nombreux conseils entourant un domaine qui, pour moi est aussi vaste qu'inexploré, l'informatique.

# **Chapitre 1**

Physiologie rénale normale

et pathologique

Le diabète insipide néphrogénique se caractérise par une diminution de la capacité de concentrer l'urine. Il est la conséquence d'une résistance rénale à l'action de l'hormone antidiurétique (1). La première partie de ce mémoire sera consacrée à la présentation de la physiologie rénale ainsi qu'aux bases moléculaires du diabète insipide néphrogénique.

## **1. Physiologie rénale normale et pathologique**

### **1.1. Anatomie et physiologie rénale**

#### **1.1.1. Structure du rein**

##### **1.1.1.1. Au niveau macroscopique**

##### **1.1.1.1.1. Le rein**

Le système rénal des mammifères est composé d'un rein gauche et d'un rein droit situés de part et d'autre de la colonne vertébrale entre la 12<sup>ème</sup> vertèbre thoracique et la 3<sup>ème</sup> vertèbre lombaire. Le rein droit est légèrement plus petit que le rein gauche du fait de la présence du foie. Une capsule fibreuse englobe chaque rein afin de les protéger des traumatismes physiques. La surface d'un rein présente deux régions distinctes : le cortex (zone d'apparence pâle en dissection) et la médullaire (région plus foncée)

Le cortex rénal représente la partie externe du rein alors que la médullaire représente la partie interne composée de pyramides rénales. Le cortex est composé des glomérules alors que la médullaire englobe l'anse de Henle, les vaisseaux sanguins (ou vasa recta) ainsi que les terminaisons des tubules collecteurs.

##### **1.1.1.1.2. La vascularisation rénale**

Le rein, de par son rôle important dans les phénomènes de régulation hydrique, présente une riche vascularisation. En effet, afin de réguler les flux hydriques de manière

constante, les deux reins reçoivent 22% du débit cardiaque ce qui représente environ 1,1 litre par minute (2).

L'artère rénale provenant de l'aorte pénètre dans les reins au niveau du hile avant de se diviser en trois artères lobaires. Ces dernières se subdivisent en artères interlobaires qui elles-mêmes se ramifient en artères arquées. Les artères interlobulaires, provenant des artères arquées, acheminent le sang à l'appareil glomérulaire composé des artérioles afférentes, des capillaires glomérulaires et des artérioles efférentes. Celles-ci se déversent par la suite dans les capillaires péri-tubulaires entourant le système tubulaire rénal. Ces capillaires péri-tubulaires fusionnent pour former les veines interlobulaires qui se regroupent pour donner les veines arquées puis les veines interlobaires et finalement les veines rénales (2).

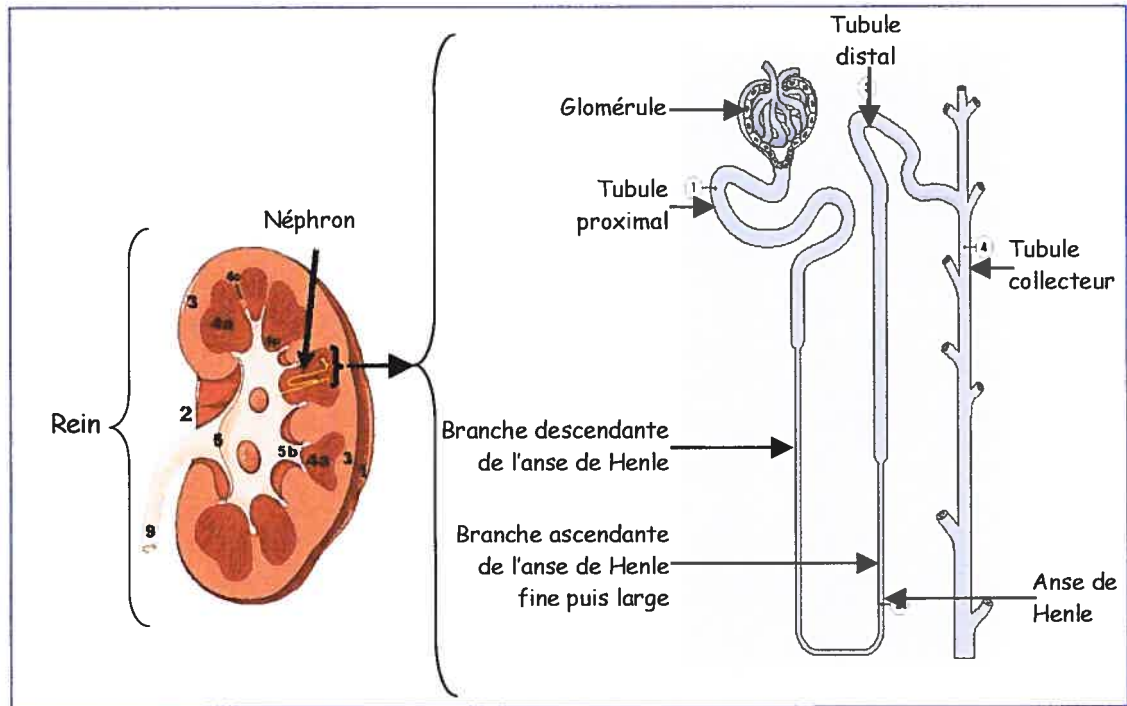
#### 1.1.1.2. Au niveau microscopique : le néphron

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein de par son rôle dans la filtration, la régulation et la concentration de l'urine. Chaque rein est constitué d'environ 1 million de néphrons. Un néphron est composé de cinq parties distinctes :

- Le corpuscule de Malpighi, constitué du glomérule et de la capsule de Bowman où le plasma sanguin est filtré;
- Le tubule proximal;
- L'anse de Henle, en forme d'épingle à cheveux, elle-même composée d'une branche descendante « fine » et d'une branche ascendante comprenant une partie médullaire « fine » et une partie corticale plus large;
- Le tubule distal;



- Le tubule collecteur conduisant au canal collecteur (Figure 1. Représentation schématique d'un rein et d'un néphron).



**Figure 1.** Représentation schématique d'un rein et d'un néphron.

### 1.1.2. Fonctions du rein.

Le rein permet à l'organisme de maintenir un environnement extracellulaire stable de toutes les cellules du corps. Cette fonction est rendue possible grâce aux contrôles que cet organe réalise sur les balances hydriques et ioniques grâce à des successions de phénomènes de sécrétion et réabsorption. Ces pertes et réabsorptions peuvent être établies en fonction de l'anatomie du rein. Enfin, en plus de ce rôle principal, le rein remplit différentes fonctions d'élimination de déchets et de sécrétion d'hormones.

#### 1.1.2.1. Fonctions tubulaires

Le filtrat urinaire provenant du sang est formé dans les glomérules puis gagne les tubules où son volume et son contenu vont être modifiés par des séries de réabsorptions/sécrétions. La majeure partie des solutés est réabsorbée au niveau du tubule proximal, l'anse ascendante de Henle, le tubule distal et le canal collecteur ne servant qu'à affiner la composition de l'urine en solutés.

##### 1.1.2.1.1. Au niveau du tubule proximal

La plupart des solutés présents dans l'urine sont activement réabsorbés au niveau du tubule proximal : le chlore, les acides aminés, le glucose, le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphate et enfin l'eau. Du fait de la haute perméabilité à l'eau de ce segment, le but principal de ce premier niveau de réabsorption est de diminuer considérablement le volume urinaire. Cependant, du fait des mouvements d'eau, l'osmolalité du filtrat n'est pas modifiée et donc celui-ci n'est pas concentré.

##### 1.1.2.1.2. Au niveau de l'anse de Henle

L'anse de Henle complète la réabsorption des solutés débutée au niveau du tubule proximal : environ 15 à 30% du sodium et du potassium, 20% du calcium le sont à ce niveau. Cependant ce segment du rein est le siège de la majeure partie de la réabsorption du magnésium circulant, environ 65% contre 30% dans le tubule proximal. La branche large ascendant de l'anse se caractérise également par une forte réabsorption de chlorure de sodium (NaCl) : cette section est responsable de 30% de la réabsorption sodée totale du néphron. Cette observation trouve son importance dans l'explication de l'établissement d'une pathologie entraînant un DIN secondaire lié à une perte de fonction des gènes qui codent pour la réabsorption du sodium, du chlore et du potassium, le syndrome de Bartter (voir section 1.2.2.1.3).

#### 1.1.2.1.3. Au niveau du tubule distal

Le tubule distal permet une forte réabsorption du potassium avant que le filtrat ne gagne le tubule collecteur : 95% de la quantité restante suite au passage et à la réabsorption dans le tubule proximal et l'anse de Henle sont réabsorbés à ce niveau. Les autres solutés ne sont que très peu réabsorbés par ce segment, qui, de plus, présente une très faible perméabilité à l'eau.

#### 1.1.2.1.4. Au niveau du tubule collecteur

Le tubule collecteur est composé de deux types cellulaires différents avec des rôles différents : les cellules principales et les cellules intercalaires. Les cellules principales du tubule collecteur sont le siège d'une importante réabsorption d'eau qui est contrôlée par l'hormone antidiurétique (ADH ou AVP) (voir section 1.1.4). Le tubule collecteur ne permet qu'une faible réabsorption de sodium, de calcium, de phosphate et de magnésium (de 2 à 5%); à l'inverse, on note à son niveau une sécrétion de potassium. La majeure partie des réabsorptions a lieu au niveau des deux populations de cellules alors que la sécrétion de potassium se fait uniquement au niveau des cellules principales.

#### 1.1.2.2. Autres fonctions du rein

Le rein intervient à différents niveaux lors de l'excrétion de déchets métaboliques (tels que l'urée, l'acide urique, la créatinine, l'acide oxalique) lors de l'élimination de produits exogènes ou de leurs métabolites (toxines, médicaments), ainsi que dans le catabolisme de protéines de faible poids moléculaire et d'hormones polypeptidiques (insuline, parathormone). Cet organe est également impliqué dans la composition des fluides biologiques et la synthèse de plusieurs hormones et autocoïdes (rénine, prostaglandines rénales) responsables de la régulation volémique et barométrique artérielle. D'autres substances sont également synthétisées au niveau du rein dont le rôle est

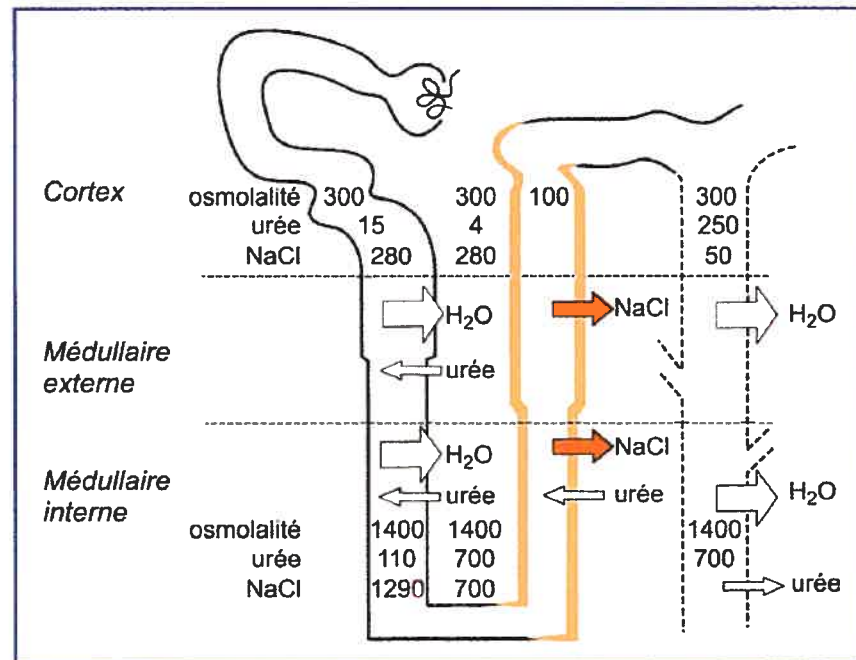
primordial pour l'organisme : l'érythropoïétine, le calcitriol ainsi que des facteurs de croissance (tel que l'Insuline-like growth factor, IGF1) (2).

De par sa vascularisation, le rein peut être soumis à des variations de pression sanguine dans les artérioles afférentes, et/ ou à des modifications de la concentration de sodium et de chlorure au niveau de la macula densa. Dans ce cas, le rein, et plus précisément l'appareil juxta glomérulaire, réagit en sécrétant de la rénine. Cette enzyme va ensuite contribuer à la production d'angiotensine II (AII) qui elle-même, va ensuite exercer son action vasoconstrictrice sur les artérioles rénales. La majeure partie de l'action vasoconstrictrice de l'AII a lieu au niveau des artérioles efférentes ce qui a pour conséquence une augmentation du taux de filtration glomérulaire (3) et (4).

Comme nous venons de le mentionner, le rein, via le système rénine angiotensine, ou système RAS comprenant l'angiotensine II, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et l'angiotensinogène, participe activement à la régulation du flux sanguin, de la filtration glomérulaire et de la réabsorption sodée. Cependant, de par leur rôle dans le développement du rein, les gènes contrôlant le système RAS semblent impliqués dans le déclenchement d'une fibrose progressive pouvant conduire à une perte de fonction rénale. Ces gènes ont été abondamment étudiés et il ressort de ces études que des altérations de leur expression peuvent être associées à des modifications de la structure et/ou de la fonction du rein (3, 5-7). Il semble en effet, que le blocage de ce système puisse contrecarrer les effets activateurs de fortes concentrations de glucose sur le gène de l'angiotensinogène, permettant ainsi de limiter la formation d'angiotensine et par là même, l'hypertrophie des cellules proximales du rein. De plus, il a été démontré que l'activation de ce système, toujours en condition d'hyperglycémie, était directement responsable de fibroses tubulaires ainsi que d'hypertrophie rénale dans les cellules de tubule proximal; cet effet est initié par le rôle activateur de l'angiotensinogène sur le gène du facteur de croissance transformant- $\beta$ 1 (TGF-  $\beta$ 1) (8, 9).

### 1.1.3. Système de drainage de l'urine

Nous avons vu que la majeure partie de l'eau était réabsorbée au niveau du système tubulaire, et plus précisément au niveau du tubule proximal. Or ce phénomène de réabsorption est un processus passif du fait que l'eau suit un gradient de concentration établi entre les tubules rénaux et le milieu interstitiel. L'établissement et le maintien de ce gradient font appel à un mécanisme de contre-courant dont les composantes principales sont l'anse de Henle (jouant le rôle de multiplicateur) et les vasa recta (jouant le rôle d'échangeur). Malgré le fait que le volume hydrique réabsorbé par l'anse de Henle soit relativement faible, 10% du volume total, la structure de chacune des branches, descendante et ascendante, n'en est pas moins importante. En effet, le segment descendant est perméable à l'eau mais pas aux ions et inversement pour le segment ascendant, imperméable à l'eau mais fortement perméable aux ions (1). Cette différence fonctionnelle importante entre les segments s'explique par la présence à la surface de la branche descendante de nombreux canaux à eau, les aquaporines-1, absents de la branche ascendante (10). Cette absence contribuant à rendre l'urine isotonique puis hypotonique. Par la suite cette urine hypotonique sera modifiée par la réabsorption de l'eau suite à l'action de l'AVP au niveau du tubule collecteur (Figure 2. Le mécanisme de concentration de l'urine page 9).



**Figure 2.** Le mécanisme de concentration de l'urine

#### 1.1.3.1. Le système de contre-courant

Tel qu'il a été précisé auparavant, la concentration des urines ne résulte pas d'un transport actif de l'eau : celui-ci nécessiterait trop d'énergie. Le mécanisme de concentration repose en fait sur une série d'interactions étroites entre l'anse de Henle, le milieu interstitiel, les vaisseaux sanguins médullaires, ou vasa recta, et les tubules collecteurs : le mécanisme de contre-courant (11). Ce mécanisme doit son nom à l'arrangement anatomique particulier des tubules et des vaisseaux sanguins : le filtrat quittant le cortex via le tubule proximal emprunte la branche descendante de l'anse de Henle puis la branche ascendante pour « remonter » en direction du cortex, chaque branche allant à contresens l'une par rapport à l'autre; le cheminement du sang dans les vasa recta suit le même processus à savoir quitter le cortex en direction de la médullaire puis remonter à contresens en direction du cortex (1). Le principe général de ce mécanisme repose sur la présence d'un gradient de concentration entre la lumière tubulaire et le milieu interstitiel. Ce gradient est la conséquence de trois phénomènes distincts : le premier étant le transport

actif du sodium et le co-transport du chlore et du potassium dans l'anse de Henle; le second est également un transport actif d'ions mais entre la lumière du tubule collecteur et le milieu interstitiel; enfin le troisième est la réabsorption de l'urée au niveau des tubules collecteurs (Figure 3. Le transport des UT1).

Comme nous l'avons indiqué succinctement, le rôle principal du tubule collecteur est une importante réabsorption de l'eau suite à la stimulation par l'AVP qui aboutira, via une cascade intracellulaire, à l'expression de canaux à eau à la surface des membranes apicales des cellules principales (pour détails se référer à la section 1.2.2. Le diabète insipide néphrogénique). En plus de cette fonction principale, l'AVP joue également un rôle dans la régulation de la réabsorption de l'urée ainsi que dans la régulation de la perméabilité de ces cellules du tubule collecteur au sodium. En effet ces cellules présentent une grande perméabilité à l'urée grâce à la présence à leur surface de transporteurs d'urée, ou UT, de type UT1 (Figure 3. Le transport des UT1 à la membrane luminale). Par conséquent, le tubule collecteur joue un rôle dans le maintien du gradient de concentration.

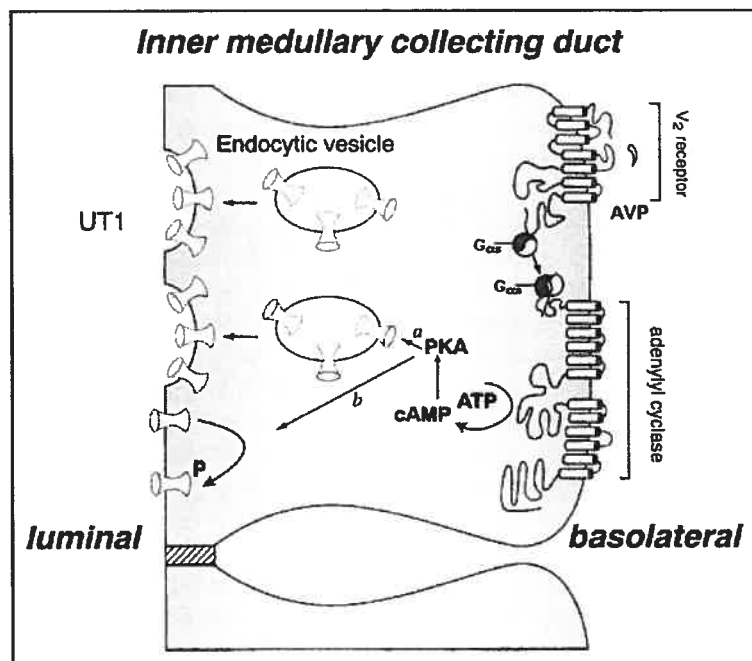


Figure 3. Le transport des UT1 à la membrane luminale

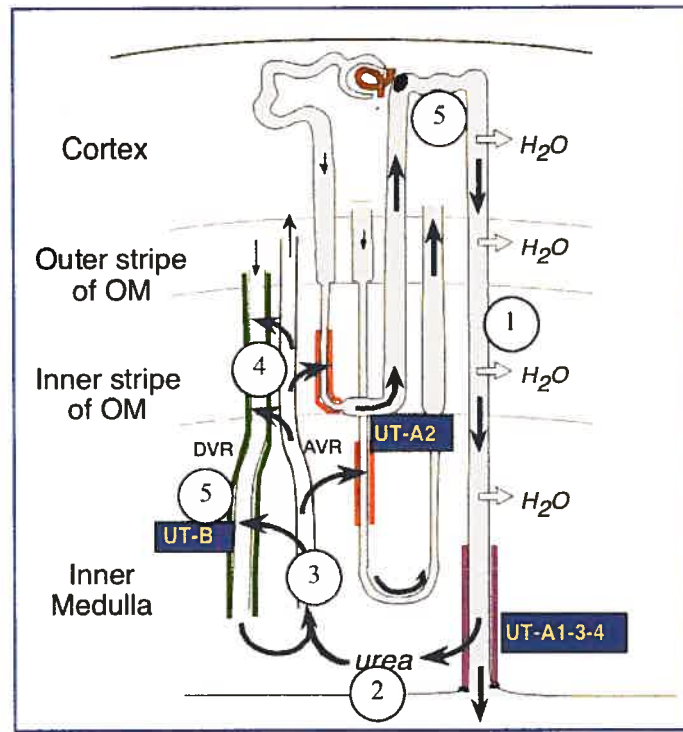
### 1.1.3.2. Le recyclage de l'urée

L'urée provenant du métabolisme hépatique des protéines est un des déchets les plus importants excrétés par le rein. De part sa concentration urinaire très élevée, 100 fois la concentration plasmatique chez l'humain (12), l'urée participe activement au contrôle du gradient de concentration. En effet, ce déchet urinaire représente de 40 à 50% de l'osmolalité du milieu interstitiel.

L'urée est réabsorbée entre la lumière des tubules collecteurs et le milieu interstitiel de la médullaire suivant deux processus, le premier étant une diffusion simple et le second faisant appel à un transporteur. Ce mécanisme de recyclage de l'urée fait donc intervenir cinq composants majeurs :

- Le tubule collecteur, où l'urée est concentrée;
- Le tubule collecteur terminal, où l'urée diffuse en direction de l'interstitium médullaire;
- Les vasa recta ascendants, où l'urée est récupérée;
- Les branches descendantes fines de l'anse de Henle et les vasa recta descendants, où l'urée est réintroduite;
- Et enfin, la médullaire interne, où l'urée est récupérée (Figure 4. Le mécanisme de recyclage de l'urée page 12).





**Figure 4.** Le mécanisme de recyclage de l'urée

#### 1.1.3.3. Le système d'échange des vasa recta

Les vaisseaux sanguins médullaires, ou vasa recta, sont hautement perméables à l'eau ainsi qu'aux solutés non protéiques. Au fur et à mesure que le sang chemine dans la branche descendante de la médulla interne, sa concentration augmente du fait de la diffusion passive d'eau vers le milieu interstitiel et la réabsorption des solutés présents dans ce même milieu. Ceci établit une concentration identique entre la vasa recta et le milieu interstitiel médullaire (1200 mOsm/L) ce qui n'entraîne pas la formation du gradient de concentration. Lorsque le sang remonte dans la branche ascendante en direction du cortex, celui-ci voit sa concentration en solutés progressivement diminuée et sa quantité d'eau augmentée, toujours suivant un phénomène de diffusion passive. Au final, l'hypertonie

du milieu interstitiel est maintenue entre la partie médullaire et la partie corticale (1), (2), (13) (Figure 5. Les vasa recta)

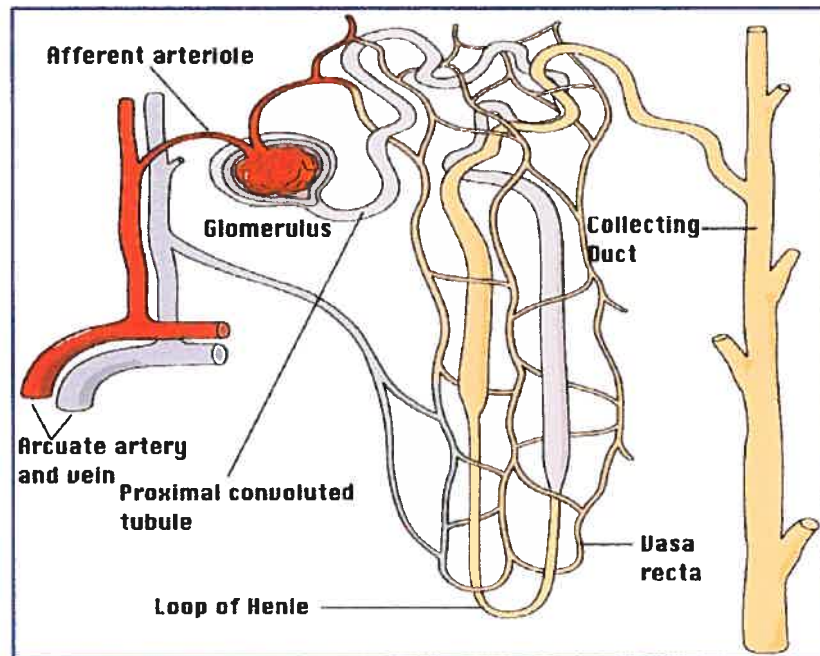


Figure 5. Les vasa recta

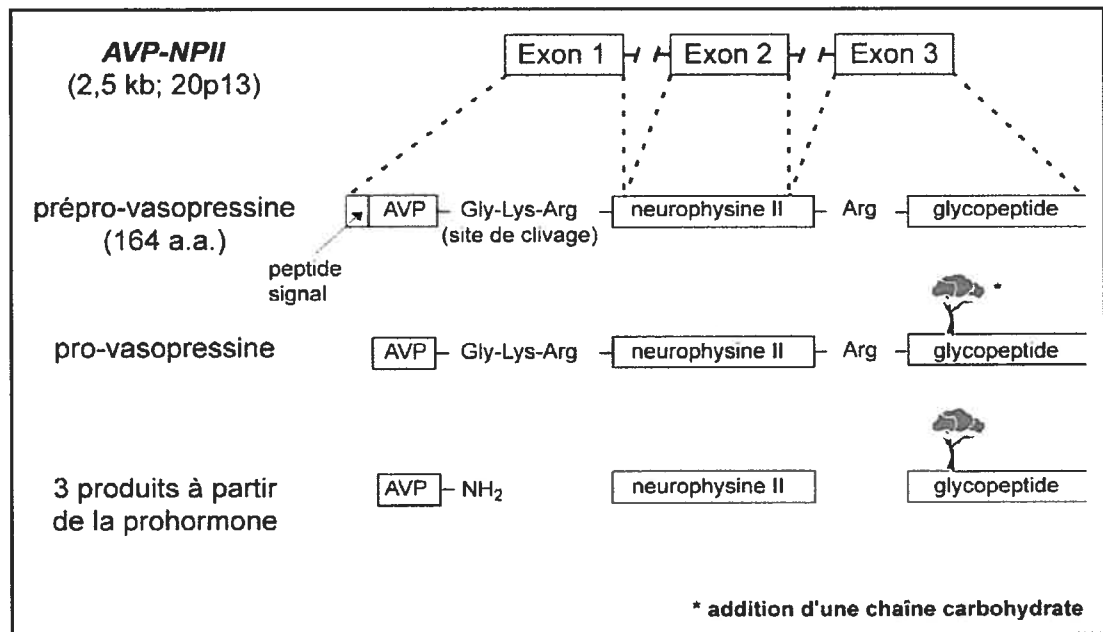
#### 1.1.4. Hormone agissant au niveau rénal : l'hormone antidiurétique

L'hormone antidiurétique, ADH, appelée aussi vasopressine, ou encore arginine vasopressine (AVP), est un polypeptide synthétisé au niveau de l'hypothalamus, transporté puis stocké dans la post-hypophyse qui le libère dans la circulation sanguine. Elle a, principalement, une action antidiurétique et une action vasopressive.

##### 1.1.4.1. Synthèse et sécrétion de l'AVP

Synthétisée au niveau des noyaux supra-optiques et paraventriculaires de l'hypothalamus à partir d'une pré hormone, polypeptide cyclique de 168 acides aminés, la

vasopressine, liée à son transporteur, la neurophysine II (NPII), est transportée jusqu'à la post-hypophyse qui la stocke (2), (14). Cette pré hormone, ou prépro-vasopressine est codée par le gène *AVP-NPII* localisé sur le locus 13 du bras court du chromosome 20 (15). Ce gène se compose de trois exons dont le premier code pour le peptide signal, l'AVP ainsi que la région amino-terminale de la NPII; le second exon code pour la région centrale de la NPII et le dernier pour la région carboxy-terminale de la NPII et le glycopeptide. Cette prépro-vasopressine va subir diverses modifications pour finalement donner trois produits : l'AVP, la NPII et le glycopeptide (16), (17) (Figure 6. La synthèse de la vasopressine).



**Figure 6.** La synthèse de la vasopressine à partir du gène de l'*AVP-NPII*

#### 1.1.4.2. Régulation de la sécrétion de l'AVP

La synthèse de l'AVP est régulée suivant deux mécanismes, l'un est osmo-dépendant alors que le second est osmo-indépendant (18).

Le premier cité se caractérise par une excitabilité très sensible des neurones, appelés osmorécepteurs, à l'osmolalité de leur environnement (19). Ces neurones, localisés entre le noyau supra-optique et le AV3V dans la région antéro-ventrale du troisième ventricule, en communication directe avec les neurones du noyau supra-optique régulent constamment la synthèse et la sécrétion d'AVP (2). Ces osmorécepteurs présentent la particularité de détecter des variations de l'osmolalité sanguine de l'ordre de 2 mOsm/kg soit moins de 1% de l'osmolalité plasmatique normale.

Le second mécanisme, osmo-indépendant, repose sur des réflexes barométriques ainsi que des réflexes pulmonaires. En effet, la réduction du volume des liquides extracellulaires et de la pression artérielle diminue la stimulation des barorécepteurs situés au niveau des oreillettes, du sinus carotidien et de l'aorte (représentant des zones de haute pression), et des veines pulmonaires (représentant une zone de basse pression). La conséquence de ces changements de pression est une augmentation, ou une diminution, de la sécrétion d'AVP (17). Il faut toutefois noter que ce second mécanisme, osmo-indépendant, est beaucoup moins sensible que le premier, qui lui est osmo-dépendant : les variations de sécrétion d'AVP ne s'observent qu'après un changement de 10% du volume sanguin et de la pression artérielle. Cette différence de sensibilité aux variations de pression et de volume reflète en fait le rôle de chacun de ces deux systèmes. En effet, le mécanisme osmo-dépendant est le processus quotidiennement mis en jeu par l'organisme afin de réguler la synthèse et la sécrétion d'AVP alors que le mécanisme osmo-indépendant n'est déclenché qu'en cas de stress comme par exemple dans le cas d'une hémorragie (2). D'autres facteurs peuvent également intervenir dans la synthèse et la sécrétion de l'AVP

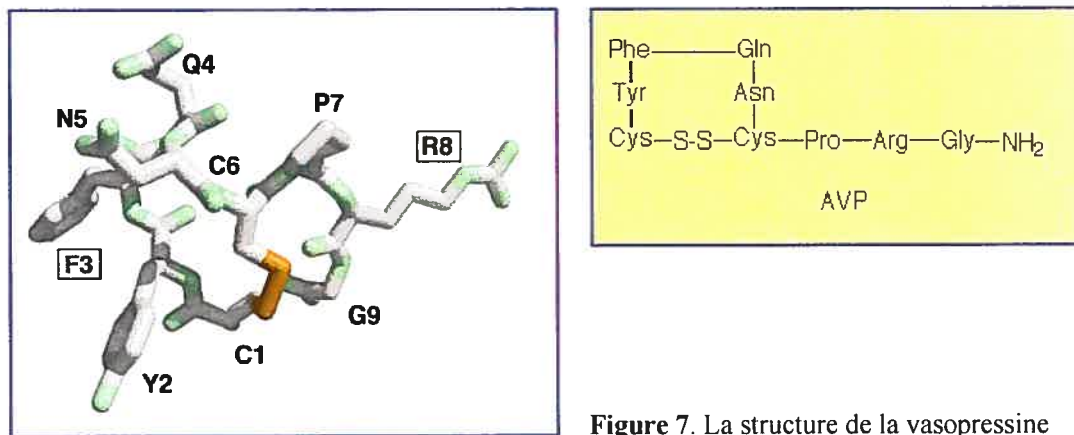
comme par exemple des variations de l'osmolalité du liquide cérébro-spinal ou encore certains stimuli comme la nicotine, la morphine ainsi que l'alcool (2), (20), (21).

#### 1.1.4.3. Rôles de l'AVP

L'hormone antidiurétique est une hormone peptidique, qui, comme nous l'avons vu, est sécrétée par les neurones hypothalamiques et extra hypothalamiques (Figure 7. La structure de la vasopressine page 17). Cependant, elle peut également être synthétisée et sécrétée au niveau périphérique : glande surrénale, endomètre utérin (22). Cette hormone remplit de nombreuses fonctions :

- Elle possède une fonction vasoconstrictive : si l'AVP est libérée au niveau synaptique du système nerveux central et périphérique, son rôle sera d'agir comme un neuromédiateur dans la régulation centrale de fonctions telles que la pression artérielle, la thermorégulation....;
- Elle a un rôle important dans l'hémostase : l'AVP a une action sur l'agrégation plaquettaire;
- Si l'AVP est libérée dans le système porte, elle participera à la régulation de sécrétions hypophysaires, comme par exemple l'ACTH ou hormone adrénocorticotrope;
- Enfin, si l'AVP est libérée dans la circulation générale, elle constituera le principal régulateur de l'élimination de l'eau par le rein;
- Par ailleurs, cette hormone participe à la régulation de la sécrétion des stéroïdes surrénaliens, de la libération de certains facteurs de coagulation et de la glycogénolyse hépatique.

Cette diversité d'action de l'AVP est étroitement liée à la stimulation de ses récepteurs spécifiques. Suivant des critères pharmacologiques et fonctionnels, ces récepteurs sont subdivisés en quatre classes : les récepteurs V1 vasculaires (V1a), les récepteurs V1 pituitaires (V1b ou V3), les récepteurs V2 rénaux (V2R) et les récepteurs de l'ocytocine (ROT) (2), (22), (23).



#### 1.1.5. Pathologies liées aux dérèglements des flux hydriques

Une mauvaise régulation des volumes et de l'osmolalité de l'ensemble de l'organisme entraîne des variations de contenu en eau et en sodium. Lorsque le système de contrôle de l'osmolalité est défectueux, on observe des désordres au niveau du métabolisme de l'eau, ce qui se traduit par des volumes d'eau trop importants ou trop faibles. Lorsque c'est le système de régulation des volumes qui est touché, on observe des désordres au niveau du métabolisme du sodium entraînant une mauvaise rétention/sécrétion de cet ion.

##### 1.1.5.1. Désordres dans le métabolisme de l'eau et le contrôle de l'osmolalité

Comme nous l'avons vu, le contrôle de l'élimination de l'eau par le rein dépend presque entièrement de la sécrétion d'AVP qui elle-même dépend des variations de l'osmolalité sanguine. Par conséquent, les principaux désordres du métabolisme de l'eau

sont sous-jacents à de mauvaises sécrétions d'AVP. Parmi ces désordres, on peut distinguer la famille des diabètes insipides, le syndrome de sécrétion inappropriée de l'ADH, ou SIADH, ainsi que la polydipsie psychogénique.

#### 1.1.5.1.1. Diabètes insipides

Les diabètes insipides sont des désordres métaboliques causés par des effets inadéquats de l'AVP. Ces types de diabète sont caractérisés par une diurèse anormalement élevée ( $>30\text{ml/kg/jour}$  pour un adulte) et de faible osmolalité ( $<250\text{ mmol/kg}$ ). Parmi l'ensemble de ces diabètes insipides, on en peut distinguer trois types :

- Le diabète insipide neurogénique (également appelé central, hypophysaire ou hypothalamique) causé par une sécrétion insuffisante d'AVP;
- Le diabète insipide néphrogénique dû à une insensibilité des cellules rénales à l'AVP (voir 1.2.2);
- Et enfin le diabète insipide dipsogénique secondaire à une polydipsie primaire.

Enfin il existe une forme temporaire de diabète insipide associé à la gestation, le diabète insipide gestationnel (17).

#### 1.1.5.1.2. Le syndrome de sécrétion inappropriée d'ADH

De hauts niveaux de sécrétion d'ADH peuvent causer une très forte réabsorption d'eau au niveau du rein. En conséquence, l'osmolalité plasmatique ainsi que la concentration en sodium du plasma atteignent des niveaux anormalement bas, ce qui aboutit à une urine trop concentrée. Ce type de désordre peut être rencontré suite à une sécrétion d'ADH induite par un stress dont l'origine peut être une situation postopératoire ou encore un état pathologique tel que le cancer du poumon à petites cellules.

#### 1.1.5.1.3. La polydipsie psychogénique

Des prises de quantités anormalement élevées d'eau peuvent être observées chez des patients souffrants de troubles psychiatriques. Chez ces personnes, ce volume trop important d'eau peut conduire à une hypo-osmolalité si la prise d'eau dépasse les capacités de l'organisme à les éliminer.

#### 1.1.5.2. Désordres dans le métabolisme du sodium

Comme nous l'avons signalé précédemment, des désordres du métabolisme du sodium s'accompagnent d'une dérégulation des volumes circulants. Parmi les désordres touchant le métabolisme du sodium, certains sont caractérisés par une perte excessive de cet ion, comme c'est le cas par exemple dans la maladie d'Adisson, et d'autres, résultent de pertes « anarchiques » de sodium.

### 1.2. Le diabète insipide

Dans la première partie intitulée « Désordres dans le métabolisme de l'eau et le contrôle de l'osmolalité », nous avons introduit de manière très succincte le terme de diabète insipide en mentionnant qu'il s'agissait d'un désordre métabolique caractérisé par une diurèse anormalement élevée. Comme précisé dans ce préambule, il n'existe pas une, mais plusieurs formes de diabètes insipides dont, entre autres, les diabètes insipides centraux et néphrogéniques.

#### 1.2.1. Le diabète insipide central

Ce type de diabète résulte d'une synthèse insuffisante d'AVP par la glande pituitaire. Le diabète insipide central, ou neurogénique, peut être de nature acquise ou héréditaire (1).



La forme acquise survient lorsque la glande a subi des dommages comme par exemple suite à un traumatisme crânien ou à une tumeur cérébrale; cependant d'autres causes sont également possibles comme par exemple suite à des réactions auto-immunes ou à des maladies granulomateuses.

La forme héréditaire est causée par des mutations autosomiques dominantes ou récessives du gène de l'*AVP-NPII* (2).

### 1.2.2. Le diabète insipide néphrogénique

Si le diabète insipide central se caractérise par une incapacité de la glande pituitaire à sécréter l'AVP, le diabète insipide néphrogénique (DIN) est causé par une incapacité des cellules rénales à répondre à l'AVP et ce, malgré une concentration d'AVP circulante normale ou élevée. Ce type de diabète peut être également de nature héréditaire ou acquise. Le DIN dans sa forme primaire, ou héréditaire, est le plus souvent causé par des mutations affectant les gènes codants pour le récepteur à la vasopressine de type 2, l'*AVPR2*, ainsi que pour le canal hydrique dépendant de la vasopressine, l'*AQP2* (11), (24). La forme acquise, ou secondaire, peut survenir suite à un traitement au lithium dans les pathologies psychiatriques mais également suite à la prise d'antidépresseurs tricycliques, d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine ainsi que de neuroleptiques (17). Certaines pathologies rénales peuvent aussi entraîner un DIN dans sa forme acquise, comme par exemple des obstructions des voies urinaires, le syndrome néphrotique et l'insuffisance rénale (25).

#### 1.2.2.1. DIN primaire ou héréditaire

Le DIN héréditaire est une pathologie relativement rare : par exemple la fréquence de cette maladie au Québec est de 8,8 par million d'habitants (26). La majorité des patients atteints de DIN dans sa forme héréditaire sont de sexe masculin (90%) et présentent des mutations au niveau du gène codant pour l'*AVPR2*. Les 10% restant de DIN héréditaires

présentent un mode de transmission autosomique récessif ou dominant avec atteinte de l'intégrité du gène codant l'aquaporine-2, membre de la famille des aquaporines (AQPs) et situé dans la région q13 du chromosome 12 (27). Enfin, une troisième forme de DIN héréditaire est le syndrome de Bartter qui touche la partie large de la branche ascendante de Henle, lieu principal de la réabsorption de sodium du néphron.

#### 1.2.2.1.1. Rôle de l'*AVPR2*

Les mutations affectant le gène de l'*AVPR2* entraînent le plus souvent des pertes de fonctions ou une séquestration de l'*AVPR2* conduisant à sa dégradation prématurée (24), (28). De part son mode de transmission, lié à l'*X*, seuls les sujets de sexe masculin sont atteints de ce type de DIN (1). Chez ces patients, une mutation au niveau de l'*AVPR2* entraîne le tableau clinique suivant : périodes de déshydratation, d'hypermnatrémie et d'hyperthermie. Chez des enfants, l'ensemble de ces signes peut conduire à des épisodes de déshydratation hypertonique compliqués, associés le plus souvent à des convulsions pouvant entraîner la mort en cas de diagnostic tardif. Cependant, le diagnostic tardif ou le traitement inadéquat pendant l'enfance s'accompagnent le plus souvent d'un retard mental et physique ainsi que d'une insuffisance rénale (29), (30). Les seuls moyens existant à l'heure actuelle pour contrer les effets du DIN lié à l'*X* sont un apport hydrique suffisant adapté aux besoins du patient, un régime pauvre en chlorure de sodium ainsi que l'administration de diurétiques (30).

Il existe à ce jour plus de 183 mutations affectant l'*AVPR2* et induisant un DIN lié à l'*X* dans plus de 239 familles disséminées à travers le monde (1), (31). Parmi l'ensemble de ces mutations, une majorité sont des mutations faux-sens (50%), mais on retrouve également des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture (27%), des mutations non-sens (11%), de larges délétions (5%), des délétions ou insertions en phase (4%), des mutations au niveau du site d'épissage et enfin une mutation complexe.

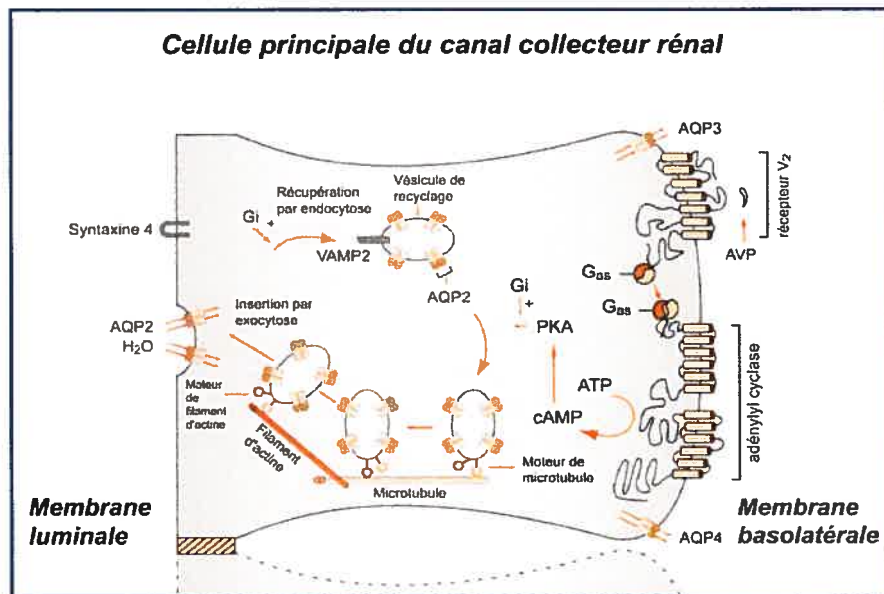
#### 1.2.2.1.2. Rôle des aquaporines (AQPs)

À la suite d'études de perfusion de dDAVP, ou 1-desamino[8-D-arginine] vasopressine, et de caractérisation de phénotypes de patients et patientes atteints de DIN, une seconde forme de cette maladie a été découverte dont la mode de transmission n'est pas lié à l'X. En effet, chez un patient atteint de DIN héréditaire, des mutations affectant les deux allèles du gène codant pour l'AQP2, un membre de la famille des aquaporines, furent découvertes (1),(32).

La perméabilité à l'eau des structures tubulaires et vasculaires impliquées dans le mécanisme de contre-courant est déterminée par la présence de canaux à eau appartenant à la famille des aquaporines (33). À l'heure actuelle, cette famille se compose de 10 membres, dénommés de AQP0 à AQP9, répartis en deux classes : les aquaporines présentant une exclusivité de transport de l'eau, les AQP0, 1, 2, 4, 5 et les aquaglycéroporines permettant le passage d'eau mais également de glycérol, les AQP 3, 7 et 9 (33), (34). La première de ces aquaporines à être identifiée fut l'AQP1 qui s'insère dans les membranes plasmiques sous forme d'homotétramères. Chaque monomère se compose de six hélices insérées de manière oblique dans la membrane et délimitant ainsi le canal par lequel l'eau va passer (33), (35). Ces aquaporines sont distribuées dans de nombreux types cellulaires différents comme par exemple l'œil, le cerveau, le rein, les poumons pour l'AQP1 et le tubule collecteur rénal pour l'AQP2 (33), (36). Cependant, la présence à la membrane plasmique des canaux AQP2 est sous-jacente à l'action de l'AVP. En effet, les molécules d'AQP2 sont séquestrées dans des vésicules intracellulaires et seront adressées à la membrane suite à une stimulation par l'AVP (Figure 8. Expression membranaire des AQP2 page 23) (33), (36).

À l'heure actuelle, 32 mutations du gène codant l'AQP2 sont identifiées parmi lesquelles on peut distinguer des mutations faux-sens (65%), des mutations avec décalage du cadre de lecture suite à des délétions ou à des insertions (23%), des mutations non-sens

(8%) et enfin des mutations au niveau du site d'épissage (4%) (1), (11). La majorité des mutations de l'*AQP2* entraînant un DIN autosomique dominant se trouvent localisées dans la partie carboxy-terminale du gène alors que les mutations récessives se répartissent dans tout le gène (37).



**Figure 8.** Représentation schématique de l'expression membranaire des AQP2

#### 1.2.2.1.3. Syndrome de Bartter

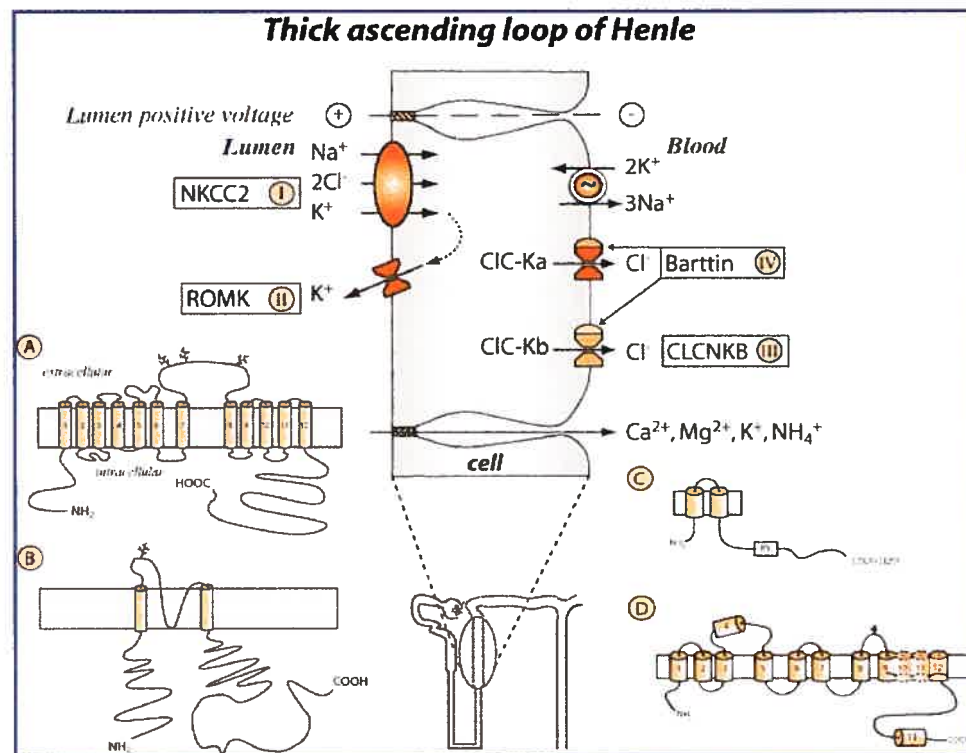
Lorsque le filtrat gagne la branche descendante de l'anse de Henle, il est concentré du fait de la grande perméabilité de ce segment à l'eau mais non aux ions (voir section 1.1.3). Par la suite, dans la branche ascendante fine, imperméable à l'eau mais pas aux ions, le filtrat présente une concentration en chlorure de sodium plus élevée que le milieu interstitiel ce qui conduit à sa dilution par perte de sodium et entrée d'urée. Cette dilution se poursuit lorsque le filtrat arrive dans la branche large de l'anse, qui est comme la branche fine, imperméable à l'eau mais hautement perméable au sodium : 30% de la quantité totale de sodium réabsorbé dans le néphron l'est à ce niveau (1). En effet, les cellules de ce

segment, qui sont imperméables à l'eau, présentent à différents niveaux plusieurs transporteurs dont le rôle principal est la réabsorption sélective de sodium afin de rétablir l'hypotonie du filtrat tubulaire :

- Un transporteur dit tritransporteur Na-K-2Cl (NKCC 2) responsable de l'entrée de chlore, de sodium et de potassium dans la cellule au niveau luminal;
- Un canal responsable de la sortie de potassium de la cellule, le canal ROMK;
- Un canal dit CLCNKB responsable de la sortie de chlorure de la cellule au niveau basal grâce à l'action d'une sous-unité, la barttine (Figure 9. Réabsorption du sodium dans la branche ascendante de l'anse de Henle page 25).

Le syndrome de Bartter est une maladie héréditaire qui se caractérise par une perte de chlorure de sodium, une alcalose métabolique hypokaliémique ainsi que par une incapacité à concentrer ou à diluer les urines (1). Ce tableau clinique provient de désordres fonctionnels des cellules de la partie large de la branche ascendante de l'anse de Henle. En effet, les gènes codant les transporteurs responsables de la réabsorption du sodium peuvent être le siège de mutations conduisant à l'apparition de syndromes de Bartter :

- Si les mutations touchent le gène codant pour le tritransporteur NKCC2 alors le syndrome de Bartter sera dit de type I (38);
- Si le gène touché code pour le canal ROMK alors le syndrome sera de type II (39);
- Lorsque les mutations touchent les gènes du canal CLCNKB et de la barttine alors les syndromes seront de type III et IV (40), (41), (42).



**Figure 9.** Réabsorption du sodium dans la branche ascendante de l'anse de Henle.

#### 1.2.2.2. DIN secondaire ou acquis

Le DIN acquis est beaucoup plus fréquent que les formes héréditaires. Cependant, la plupart du temps il est partiel et relève de nombreuses causes : il n'est que la conséquence d'autres pathologies, comme par exemple l'insuffisance rénale chronique. Il peut également apparaître suite à l'emploi excessif de médicaments, comme les sels de lithium indiqués dans le traitement de certaines pathologies psychiatriques; enfin, il peut être secondaire à un trouble électrolytique, comme une hypokaliémie ou une hypercalcémie.

##### 1.2.2.2.1. L'insuffisance rénale chronique ou IRN

Le DIN acquis est relativement fréquent chez les personnes atteintes d'insuffisance rénale car la majorité des patients souffrant de cette pathologie présentent des réductions de

leur capacité à concentrer les urines du fait de la destruction d'une partie de leur « population » de néphrons. En effet, au cours de l'insuffisance rénale, cette perte de capacité à concentrer les urines est, en partie, liée à une augmentation de l'excrétion de solutés par néphron fonctionnel (25).

#### 1.2.2.2.2. DIN et médicaments

La cause la plus fréquente de DIN acquis suite à l'emploi de médicaments est l'administration chronique de lithium pour traiter certaines pathologies psychiatriques, en particulier les psychoses maniacodépressives (43). Le mécanisme proposé pour expliquer l'implication du lithium dans l'anomalie de concentration des urines serait une inhibition précoce de la voie de signalisation activée par l'AVP et /ou une diminution de l'expression de l'AQP-2 à la membrane apicale (17), (44). D'autres médicaments inhibiteurs de l'AVP sont impliqués dans l'apparition du DIN dans sa forme acquise : les antidépresseurs tricycliques, les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, ainsi que les neuroleptiques (17).

#### 1.2.2.2.3. Hypercalcémie ou hypokaliémie

Chacune de ces pathologies peut entraîner l'apparition d'un DIN secondaire caractérisé par une résistance des cellules rénales à l'AVP. Ces deux anomalies sont associées à des défauts de la réabsorption de chlorure de sodium au niveau de la branche ascendante large de l'anse de Henle et de la capacité de l'AVP à augmenter la perméabilité hydrique dans le tube collecteur. Cependant, le défaut de concentration est moins sévère dans le cas de l'hypokaliémie que dans le cas de l'hypercalcémie (45).

La régulation ainsi que le maintien des volumes circulants sont deux éléments essentiels de la vie de tout organisme vivant. Le principal acteur de cette régulation est le rein, qui, de par son anatomie et sa physiologie complexes, est en charge de jauger, en fonction des conditions environnantes, ce qui doit être éliminé ou au contraire conservé. Une des principales fonctions de cet organe est la réabsorption/élimination de l'eau suite à l'action d'une hormone spécifique, l'AVP, sécrétée uniquement lorsque les conditions physiologiques le nécessitent et n'agissant qu'au niveau d'un segment particulier du rein, le tubule collecteur. Ce lieu d'action est déterminé par la présence de récepteurs spécifiques à l'hormone, les récepteurs à la vasopressine de type 2 à la surface des cellules. Une pathologie rare, le diabète insipide néphrogénique est causée, entre autres, par des défauts de structure et de fonction de ces récepteurs. Ces anomalies de structure et de fonction sont en fait causées par des défauts au niveau du gène codant ces récepteurs. Il semble désormais intéressant d'étudier plus en détails les caractéristiques structurales et fonctionnelles des récepteurs à l'AVP et plus précisément des récepteurs de type 2 (AVPR2).



## **Chapitre 2**

Les récepteurs de la vasopressine  
et le  
diabète insipide néphrogénique

Comme mentionné auparavant, l'hormone antidiurétique exerce plusieurs fonctions totalement différentes : rôle dans la réabsorption de l'eau, dans l'agrégation des plaquettes, dans la stimulation de sécrétion d'ACTH, dans la régulation de fonctions somatiques telle que la pression artérielle, etc. Cette diversité d'action de l'AVP est étroitement liée à la stimulation de ses récepteurs spécifiques qui sont subdivisés en trois classes : les récepteurs V1 vasculaires (V1a), les récepteurs V1 pituitaires (V1b ou V3), et les récepteurs V2 rénaux (V2R ou AVPR2 pour arginine vasopressin receptor 2) (2), (23). Chez l'homme, et la plupart des vertébrés, l'AVP, est, entre autres, responsable de la perméabilité du rein à l'eau. Elle exerce son effet via ses récepteurs spécifiques localisés exclusivement au niveau des cellules du tubule collecteur : les récepteurs à la vasopressine, ou AVPR2. De nombreuses études d'inactivation génique ont permis de mettre en évidence l'étroite relation existant entre l'apparition d'un diabète insipide néphrogénique héréditaire et le gène codant l'*AVPR2* (46), (47), (48), (49), (50).

Suite à une présentation générale des récepteurs à l'AVP, la classe de récepteurs à laquelle ils appartiennent, leurs structures ainsi que leurs voies de signalisation activées suite à leurs stimulations, nous nous intéresserons plus particulièrement aux récepteurs V2.

## **2. Les récepteurs à la vasopressine et DIN**

### **2.1. Les types de récepteurs**

La vasopressine transmet ses informations aux cellules cibles par l'intermédiaire de ses trois récepteurs : les récepteurs V1 vasculaires (V1a), les récepteurs V1 pituitaires (V1b ou V3), et les récepteurs V2 rénaux (V2R ou AVPR2). Il faut ajouter à cette liste les récepteurs de l'ocytocine (ROT) présents chez la femme allaitante et régulant le métabolisme du galactose et la tonicité utérine au moment de l'accouchement (22).

### 2.1.1. Classe de protéine

Chacun des récepteurs de l'AVP a été abondamment cloné et séquencé. Il ressort de ces travaux qu'ils appartiennent tous à la famille des récepteurs à sept passages transmembranaires (TM) dont la signalisation se fait par l'intermédiaire d'une protéine G hétérotrimérique : ce sont donc tous des RCPG, ou récepteurs couplés aux protéines G (51), (52), (53). Cette super famille regroupe le plus grand nombre de récepteurs connus : il y a près de 800 gènes et pas moins de 1000 RCPG identifiés à l'heure actuelle parmi lesquels on retrouve la rhodopsine, les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques, muscariniques etc. (1), (54), (55) (Figure 10. Les récepteurs couplés aux protéines G).

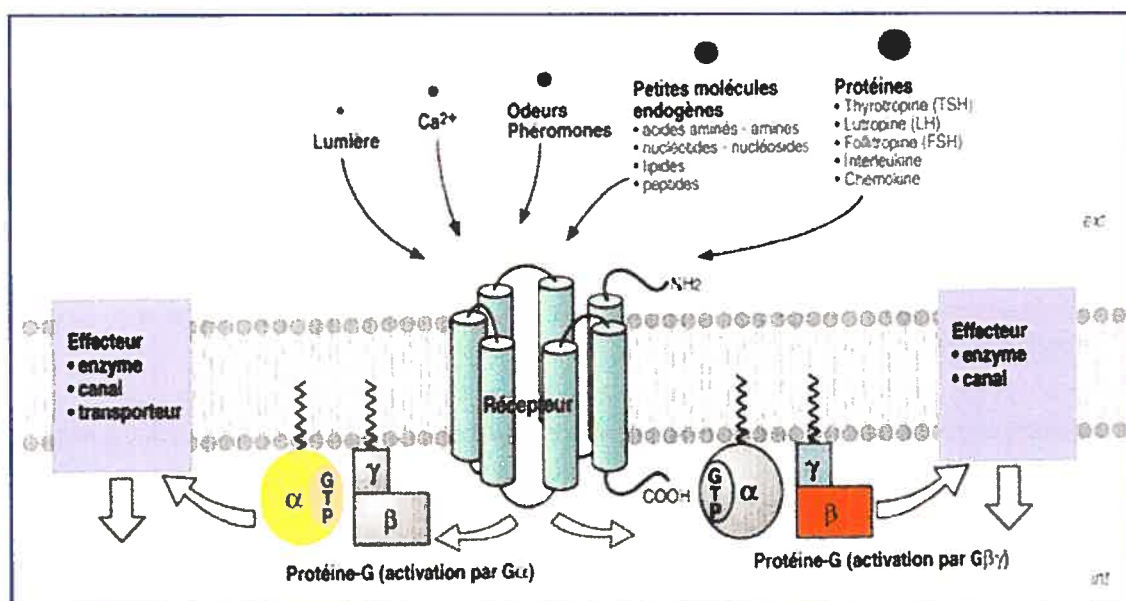


Figure 10. Les récepteurs couplés aux protéines G

Chacun des RCPG est obligatoirement associé à une protéine G, appartenant toutes à la famille des hydrolases régulatrices de nucléotide à guanosine triphosphate (GTP). Chaque protéine G se compose de trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) dont le rôle est de transmettre l'information véhiculée par le ligand, hormone ou autre, à un ou plusieurs

effecteurs intracellulaires. Les nombreuses protéines G sont divisées en quatre classes principales :

- Les protéines Gs qui activent l'adénylate cyclase;
- Les protéines Gi qui inhibent l'adénylate cyclase;
- Les protéines Gq qui activent la phospholipase C;
- Enfin, les protéines G<sub>12/13</sub> dont les fonctions exactes ne sont pas connues.

#### 2.1.2. Localisation et voie de signalisation

Dans cette section ne seront traités que les récepteurs V1a, V1b et ROT. L'AVPR2 fera l'objet d'une section spéciale ultérieurement (section 2.2).

##### 2.1.2.1. Les récepteurs V1a

Ces récepteurs sont localisés principalement dans les cellules hépatiques, les cellules des muscles lisses vasculaires ainsi que dans les plaquettes. Cependant, on en trouve également dans le rein, les organes reproducteurs, le cerveau, la rate ainsi que dans certaines cellules cancéreuses.

Suite à la liaison de l'AVP, les récepteurs V1a, couplés aux protéines Gq/11, vont activer la phospholipase C (PLC) ce qui conduit à la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol-1,4,5 triphosphate (IP3). Ce dernier, de par ses propriétés hydrosolubles et de diffusion, servira de second messenger et conduira à une mobilisation intracellulaire de calcium à partir du réticulum endoplasmique et entraînera une réponse physiologique telle que l'agrégation plaquettaire, la glycogénolyse hépatique ou encore une vasoconstriction au niveau des vaisseaux sanguins (56).

### 2.1.2.2. Les récepteurs V1b

Ce sous-type de récepteurs à l'AVP, également appelé V3, a été initialement identifié à la surface des cellules corticotropes. Il semble désormais acquis que ce type de récepteurs ne soit pas retrouvé exclusivement dans ce tissu : les cellules rénales, encéphaliques, pancréatiques et surrénaliennes expriment également ce récepteur.

La voie de signalisation engendrée suite à la liaison de l'AVP sur les récepteurs V1b est hautement similaire à celle retrouvée dans le cas des récepteurs V1a : activation d'une phospholipase, production de DAG et d'IP3 entraînant une mobilisation du calcium intracellulaire. Cependant, il semblerait que ce sous-type de récepteur soit couplé avec les protéines Gq/11, activatrices de la phospholipase C, mais également avec les protéines Gi, inhibitrices de l'adénylate cyclase (57). Ce sous-type de récepteurs est directement responsable de la sécrétion d'ACTH par l'antéhypophyse.

### 2.1.2.3. Les récepteurs de l'ocytocine

Ces récepteurs sont exprimés exclusivement chez la femme au niveau des cellules de l'endomètre, du myomètre utérin, de la glande mammaire et leur nombre varie avec les phases du cycle ovarien ainsi qu'en période d'allaitement (53).

La voie de signalisation suite à la liaison de l'AVP aux récepteurs ROT est, comme dans le cas des récepteurs de type V1 (V1a et V1b), couplée à la phospholipase C, suite à l'activation des protéines Gq/11.

## 2.2. Les récepteurs à la vasopressine de type2 : Les AVPR2

Ces récepteurs sont exprimés, au niveau du rein, exclusivement à la membrane basolatérale des cellules principales du tubule collecteur de la médulla interne. Ils sont responsables de l'action antidiurétique de l'AVP : suite à la liaison de celle-ci, l'AVPR2 va

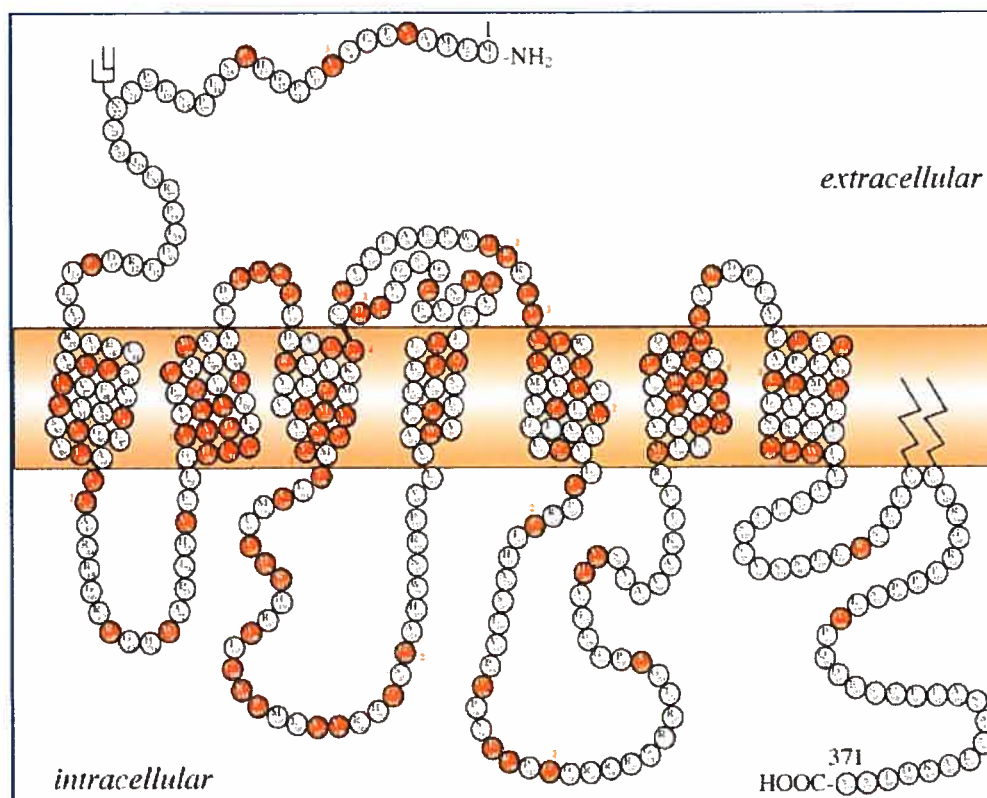
déclencher une cascade intracellulaire aboutissant à l'expression de molécules d'AQP2 au niveau de la membrane luminale des cellules principales. Ces canaux hydriques permettront une réabsorption d'eau importante entre le sang et le tubule collecteur avec pour conséquence une concentration de l'urine à éliminer. Cependant, une déficience ou anomalie d'une quelconque étape de la cascade de signalisation sera à l'origine d'une imperméabilité à l'eau des cellules du tubule collecteur et donc d'un diabète insipide néphrogénique.

La partie qui suit sera consacrée à un rappel des notions entourant les AVPR2 ainsi qu'à une analyse moléculaire du gène codant ce récepteur.

### 2.2.1. Généralités des AVPR2

#### 2.2.1.1. Classe de protéine

Les nombreuses études de clonage moléculaire de l'AVPR2 ont confirmé l'appartenance de ce récepteur à la grande famille des RCPG. Sa structure générale révèle, comme l'ensemble des autres récepteurs à l'AVP, sept hélices transmembranaires hydrophobes, trois boucles intracellulaires, 3 boucles extracellulaires, une extrémité amino-terminale extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire. De plus, ce récepteur présente la « structure biochimique » caractéristique de la plupart des RCPG : on retrouve en effet un site de glycosylation dans les domaines extracellulaires, un pont disulfure entre deux résidus cystéine hautement conservés dans le troisième segment transmembranaire et la deuxième boucle extracellulaire, et enfin deux résidus cystéine palmitoylés dans l'extrémité carboxy-terminale (23), (58) (Figure 11. Représentation schématique du récepteur V2 de la vasopressine page 34).

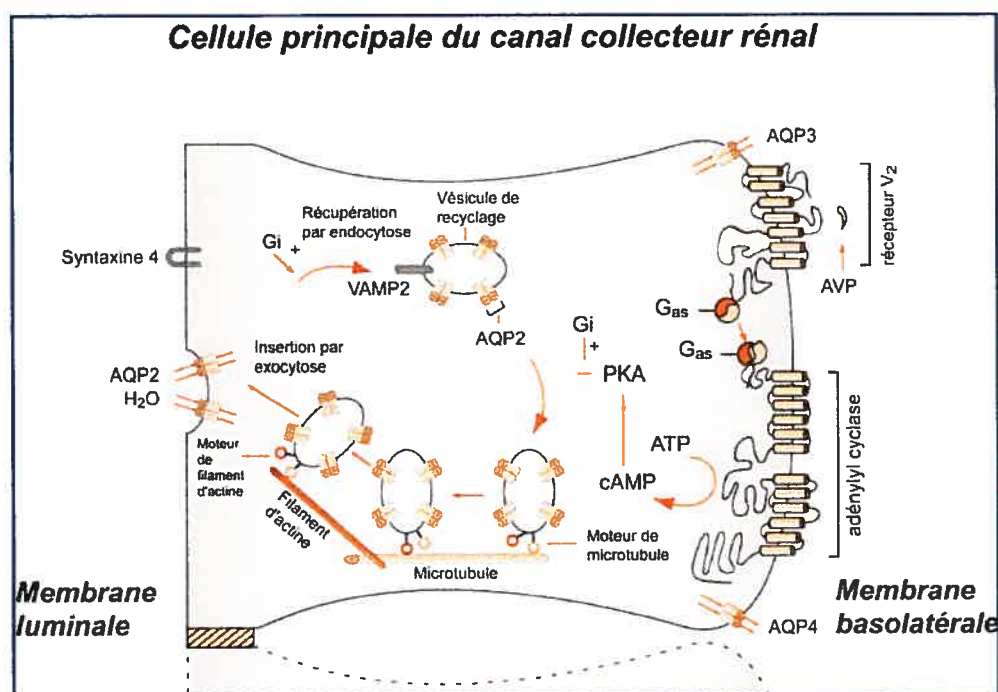


**Figure 11.** Représentation schématique du récepteur V2 humain de la vasopressine

#### 2.2.1.2. Voie de signalisation

La liaison AVP-AVPR2 est responsable de l'activation de l'adénylate cyclase couplée spécifiquement à l'AVPR2. Contrairement à la protéine G couplée aux récepteurs V1a, V1b et ROT qui est de type Gq/11, l'AVPR2 est couplé au sous-type Gs ou stimulatrice. Cette activation de l'adénylate cyclase, suite à l'hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP), va entraîner une accumulation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans la cellule. Cette accumulation va être à l'origine d'une série d'événements, activation de protéines kinases, phosphorylation de molécules, conduisant à la modification de la position des microtubules du cytosquelette subapical et à la fusion de vésicules endocytaires contenant plusieurs molécules d'AQP2, ou agrégophores, à la membrane luminale (Figure 12. Représentation schématique de la cascade intracellulaire conduisant à

l'expression des AQP2 suite à la liaison de l'AVP). Cette fusion va permettre l'enchâssement des molécules d'AQP2 à la membrane ce qui entraînera une augmentation significative de la perméabilité à l'eau de cette dernière et donc une réabsorption d'eau à partir du filtrat tubulaire. Un tel mécanisme est dit à court terme car il fait suite à l'activation du récepteur et à l'accumulation d'AMPc dans la cellule; or ces molécules d'AMPc sont rapidement dégradées et la dissociation de l'AVP de son récepteur entraîne l'internalisation des molécules d'AQP2 et donc une réduction de la perméabilité des cellules à l'eau. Il existe un second mécanisme, dit à long terme, dans lequel l'accumulation d'AMPc va activer la protéine kinase A (PKA) dont les sous-unités catalytiques vont diffuser jusqu'au noyau où elles vont, suite à la phosphorylation de protéines régulatrices, activer la transcription du gène de l'AQP2. Suite à la transcription et à la traduction, les molécules d'AQP2 sont stockées dans les agrégophores jusqu'à la prochaine stimulation par l'AVP (59), (60).



**Figure 12.** Représentation schématique de la cascade intracellulaire conduisant à l'expression des AQP2 suite à la liaison de l'AVP



### 2.2.2. Analyse moléculaire de l'*AVPR2*

Le clonage du gène humain codant pour le récepteur de la vasopressine de type 2 a été réalisé en 1992 par l'équipe de M. Birnbaumer. Cette étude a permis de montrer que l'ADNc codant ce récepteur était constitué de 1163 nucléotides contenant un cadre de lecture ouvert (51). D'autres travaux ont confirmé l'appartenance de ce récepteur à la famille des RCPG dont le gène est localisé au locus 28 du bras long du chromosome X (Xq28), ce qui correspond à la partie distale du chromosome (1). Ce gène, relativement petit, 2 kb, est composé de trois exons et de deux introns et code pour une protéine à sept segments transmembranaires de la famille des RCPG.

#### 2.2.2.1. DIN par mutation de l'*AVPR2*

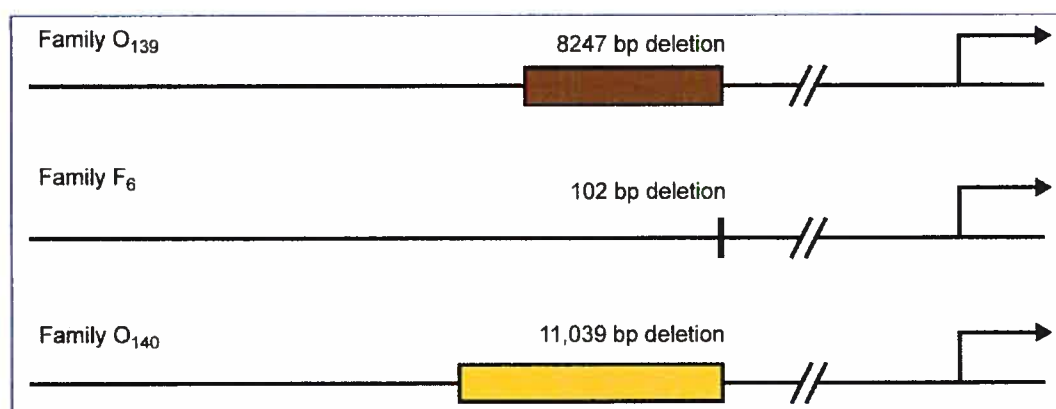
Le rôle du récepteur dans l'apparition d'un DIN a fait l'objet de nombreux travaux ce qui a permis de mettre en évidence diverses anomalies de ce gène. En effet, l'équipe de W. Rosenthal a démontré en 1993 que des patients atteints de DIN héréditaires présentaient une délétion qui modifiait le cadre de lecture et entraînait une terminaison prématurée de la transcription du gène (61). Depuis, plus de 183 mutations différentes ont été répertoriées chez des familles disséminées à travers le monde (1), (26) (Figure 11. Représentation schématique du récepteur V2 humain à la vasopressine page 34).

La majorité des mutations identifiées sont des mutations faux-sens c'est-à-dire qu'il y a une substitution d'un acide aminé (aa), dit « normal », par un autre acide aminé, dit « mutant ». Ce type de mutations entraîne la synthèse d'un récepteur dont la structure est modifiée sur un acide aminé seulement. Le reste des mutations aboutissent à la formation d'un récepteur tronqué soit par décalage du cadre de lecture après une délétion ou une insertion, soit par mutation ponctuelle non-sens c'est-à-dire par création d'un signal de terminaison, ou codon stop. Enfin, de grandes délétions ont été répertoriées. Plus récemment, l'équipe du Dr. Bichet a identifié des mutations uniques dites « privées », des

mutations récurrentes ainsi que d'éventuels mécanismes de mutagenèse (26), (62). Certaines mutations ont été caractérisées au plan fonctionnel ce qui a permis de valider leur responsabilité dans l'origine du défaut d'insensibilité du tube collecteur du rein à l'action de l'AVP. En effet, les études d'expression *in vitro* des mutations récurrentes ont démontré que la majorité des récepteurs mutés étaient retenus dans le réticulum endoplasmique et ne pouvaient gagner la membrane plasmique et donc perdaient leur fonction de signalisation (1), (11).

#### 2.2.2.2. *AVPR2* normal et DIN lié à l'X

Plus récemment, le laboratoire du Dr. Bichet a mis en évidence, chez des patients présentant tous les signes cliniques de DIN, l'absence de mutations au niveau des gènes de l'*AVPR2* et de l'*AQP2* mais une ségrégation parfaite entre le phénotype et les marqueurs du locus Xq28. L'ensemble de ces marqueurs couvre environ 1 mégabase (Mb). En effet, l'analyse génétique de familles avec un DIN lié à l'X est réalisée par séquençage direct après amplification de l'ADN génomique par réaction de polymérisation en chaîne, ou PCR. Cette amplification est rendue possible par l'emploi de diverses amorces spécifiques du gène du récepteur rénal de type 2. Or l'étude de l'ADN de trois familles a révélé un gène *AVPR2* normal par séquençage. Ceci laissait croire que l'apparition du DIN était liée, non pas à un défaut du récepteur dû à une mutation éventuelle du gène, mais plutôt à une non-expression de celui-ci. Devant ce constat, les régions amont et aval du gène ont été amplifiées suivant la même technique PCR avec des couples d'amorces spécifiques. Les régions étudiées couvrent 50 kb en amont et 20 kb en aval du gène. Au final, trois zones délétées furent découvertes (de 102 pb, 8 kb et de 11 kb), toutes situées en amont du gène de l'*AVPR2* et ségréguant parfaitement avec le phénotype de DIN lié à l'X. La zone de 102 pb se situant à l'intérieur de la zone de 8 kb (Figure 13. Représentation schématique des délétions en amont de l'*AVPR2* page 38).



**Figure 13.** Représentation schématique des délétions en amont de l'*AVPR2*

Se pose alors la question de savoir si ces zones délétées n'interviennent pas à un quelconque niveau lors de l'activation de la transcription de l'*AVPR2* et ne seraient pas responsables de l'expression exclusive de ce récepteur dans les cellules du tubule collecteur rénal. Afin de répondre à cette interrogation, il convient d'étudier plus en détail le promoteur de l'*AVPR2*. En effet, chez les organismes eucaryotes, quelque soit le gène considéré, toute activation de la transcription a lieu au niveau du promoteur (63, 64). Malheureusement l'existence d'un promoteur ne permet pas à elle seule d'expliquer le mécanisme complexe de la transcription (chapitre 3. La transcription des gènes eucaryotes).

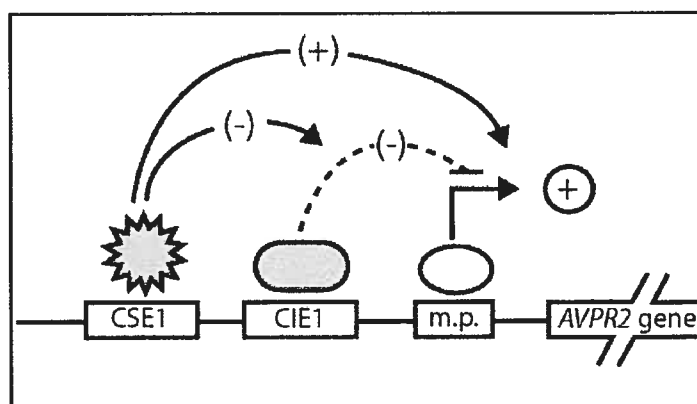
#### 2.2.2.3. Le promoteur de l'*AVPR2*

L'équipe du Dr. Rossert a étudié le mécanisme de transcription du gène de l'*AVPR2*. Il ressort de leurs travaux plusieurs points essentiels à la compréhension du mécanisme général d'activation de la transcription de ce gène. En effet, cette équipe a mis en évidence que le promoteur de ce gène est, contrairement à de nombreux gènes eucaryotes, dépourvu de l'élément initiateur de la transcription, la boîte « TATA » (chapitre 3. La transcription chez les eucaryotes). De plus, lors des expériences visant à caractériser le site d'initiation de la transcription, premier nucléotide transcrit, il ressort que celui-ci se trouve très éloigné du site d'initiation de la traduction, qui lui correspond au premier acide

aminé incorporé dans la protéine. Cependant, grâce à des expériences d'analyse par « balayage » de la zone amont de ce promoteur, ces chercheurs ont identifié deux régions importantes en amont du gène qui participent à sa régulation dans des cellules du tubule collecteur :

- Une région *cis*-régulatrice (nommée CIE1 pour collecting duct inhibitory element 1) localisée entre 1 et 2 kb en amont du gène, liant un élément inhibiteur;
- Une séquence *cis*-activatrice (nommée CSE1 pour collecting duct stimulatory element 1) de 33 pb positionnée à plus de 4 kb en amont du gène.

Il a été démontré que cette dernière séquence entraînait une expression de l'*AVPR2* dans les cellules de tubule collecteur mais pas dans les autres lignées; ce qui confirme l'hypothèse suivant laquelle un élément *cis*-régulateur serait responsable de l'expression «tissu-spécifique» de l'*AVPR2*. Cependant, les résultats obtenus par cette équipe démontrent que les deux séquences identifiées interagissent entre elles, et peut être avec d'autres éléments, pour réguler la transcription de l'*AVPR2*. En effet, il semble que le rôle de l'élément activateur, CSE1, serait préférentiellement d'inhiber CIE1 plutôt que d'activer directement la transcription : l'activateur inhiberait l'inhibiteur (Figure 14. Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle de l'*AVPR2*) (65).



**Figure 14.** Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle de l'*AVPR2*. CSE1: Collecting duct stimulatory element 1; CIE1: Collecting duct inhibitory element 1; m.p.: promoteur minimal de l'*AVPR2* (65).

# **Chapitre 3**

## **La transcription chez les eucaryotes**

Suite à l'observation suivant laquelle des patients atteints de DIN présentaient des gènes de l'*AVPR2* et de l'*AQP2* normaux mais étaient atteints de délétions en amont du gène de l'*AVPR2*, il a été suggéré que ces zones délétées pourraient lier des protéines impliquées dans l'activation de la transcription de ce gène. Il convient donc de se pencher plus avant sur l'aspect transcriptionnel des gènes eucaryotes.

### **3. La transcription chez les eucaryotes**

Tout organisme, unicellulaire ou multicellulaire, renouvelle sans cesse son contenu protéique, soit à des moments précis de la vie des cellules, par exemple au moment précédent la division cellulaire afin que chaque cellule fille puisse fonctionner une fois formée, soit de manière constitutive afin qu'une cellule ait à sa disposition tout le bagage protéique nécessaire à sa survie. Ce renouvellement, qui est un processus complexe, vise à donner, à partir de l'ADN une protéine qui pourra ensuite remplir une fonction physiologique, seule ou grâce à des interactions avec d'autres éléments. La première étape de ce processus, la transcription, est le transfert de l'information de la molécule d'ADN à un messenger dont le rôle sera de transmettre cette information afin que celle-ci soit décodée et traduite en une protéine fonctionnelle. Le mécanisme nécessaire au bon déroulement de cette étape présente des caractéristiques communes à bon nombre d'espèces et d'organismes vivants. Cette conservation et ces similitudes se retrouvent également au niveau de l'évolution : ceci est révélateur de la haute importance de ce processus dans la pérennisation de la vie des cellules et donc des organismes dans leur ensemble.

Le phénomène de l'expression des gènes eucaryotes étant très complexe, nous ne nous attacherons à donner ici que les notions essentielles et nécessaires à la bonne compréhension du déroulement de la transcription. Cette partie sera donc consacrée à des rappels théoriques concernant les gènes eucaryotes, la transcription de ces gènes et la régulation de celle-ci.

### 3.1. Les gènes eucaryotes

#### 3.1.1. Types de gènes et de polymérases

Du fait de leur complexité et de leur grand nombre de gènes (20 000 différents), les organismes eucaryotes, contrairement aux procaryotes unicellulaires tels que les bactéries, les virus etc., ne présentent pas un mais trois types de gènes différents, chacun étant responsable de la production d'ARN, ou acide ribonucléique, précis:

- Les gènes de classe I : codent pour des protéines constitutives des ARN ribosomaux (ARNr 18S pour la petite sous-unité et ARNr 5.8 et 28S pour la grande sous-unité);
- Les gènes de classe II : codent pour de petits ARN impliqués dans l'épissage (excision des séquences non codantes, les introns) de la molécule d'ARN messenger primaire, les SnARN, ou petits ARN nucléaires. Cependant leur principale fonction est de coder pour tous les ARN messagers primaires, ou pré-ARNm, donnant les protéines fonctionnelles ;
- Les gènes de classe III : codent pour les ARN responsables de la prise en charge des aminoacides dans le cytoplasme cellulaire, les ARN de transfert ou ARNt, en vue de la traduction du messenger en protéine. Ils codent également le dernier ARN ribosomal de la grande sous-unité, l'ARNr 5S.

De la même manière qu'il y a trois classes de gènes, il y a trois types d'ARN polymérases chargées de transcrire ces gènes. La classification de celles-ci dépend, non seulement de la classe de gène qu'elles sont chargées de transcrire, mais également de leur localisation nucléaire. En effet, l'ARN polymérase I, ou ARN pol. I, prend en charge les gènes de classe I et se situe dans le nucléole alors que les ARN pol. II et III sont localisées

dans le nucléoplasme, partie du noyau excluant le nucléole, et transcrivent respectivement les gènes de classe II et de classe III (66-68).

Dans la suite de cette présentation, nous ne parlerons plus que des gènes de classe II dans la mesure où leur expression conduit à la formation de toutes les protéines exprimées dans une cellule, les autres types de gènes ne codant que pour des ARN ribosomaux et de transfert.

### 3.1.2. Structure d'un gène de classe II

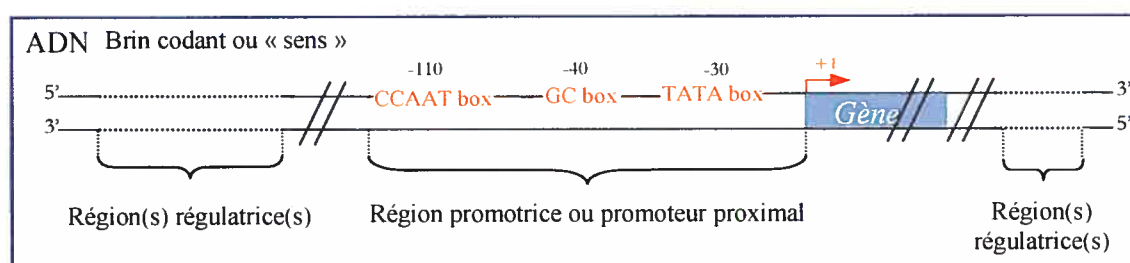
La transcription d'un gène de classe II débute avec la reconnaissance par l'ARN pol. II d'un site spécifique situé juste en amont du gène : le promoteur ou région promotrice. Cependant, d'autres régions, dont le rôle est essentiel, sont impliquées dans le processus de transcription, les régions régulatrices.

#### 3.1.2.1. La région promotrice ou promoteur proximal

Cette région promotrice correspond au voisinage direct du site d'initiation de la transcription : généralement comprise de -250 à +250 nucléotides par rapport à ce site d'initiation (noté +1) et comprenant une zone particulière, appelée « cœur » du promoteur, qui est directement responsable de l'activation de la transcription. En effet, à l'intérieur de ce cœur se trouve une séquence très conservée au cours de l'évolution, et pour cette raison appelée séquence consensus, la boîte TATA dénommée ainsi du fait de sa richesse en bases thymine et adénine (69). Cette dernière, située à environ 40 pb en amont du site d'initiation, est le siège de la formation d'un complexe d'initiation de la transcription formé de différents facteurs, les facteurs généraux de la transcription ou FT et de l'ARN pol. II (68-70). Il est très important de noter que si cette séquence particulière est présente dans la majorité des gènes eucaryotes, certains en sont dépourvus; dans ce cas, la transcription est initiée grâce à d'autres séquences : « l'élément initiateur », ou Inr pour initiator region, et/ou « l'élément aval du cœur du promoteur », ou DPE pour downstream core promoter



element (69, 71), (section 3.2.1). L'initiation de la transcription de tels gènes fera appel aux mêmes facteurs généraux de transcription que les gènes possédant une « boîte TATA » plus quelques protéines particulières (69, 72). Quelques fois, en complément de la boîte TATA, d'autres séquences sont retrouvées, les boîtes GC et CCAAT. Leur rôle serait de lier des protéines facilitant le recrutement de l'ARN pol. II et/ou des FT (73) (Figure 15. Structure d'un gène de classe II).



**Figure 15.** Structure d'un gène de classe II

Si les séquences comprises dans cette région promotrice sont nécessaires à l'activation de la transcription, en particulier la « boîte TATA », elles n'en sont pas moins insuffisantes. En effet, la présence de cette région permet l'initiation de la transcription, mais les quantités de protéines produites, suite à cette « simple » activation, ne seraient pas suffisantes pour subvenir aux besoins de la cellule et à son fonctionnement. Un second type de régions joue un rôle primordial dans le processus de la transcription : les régions régulatrices.

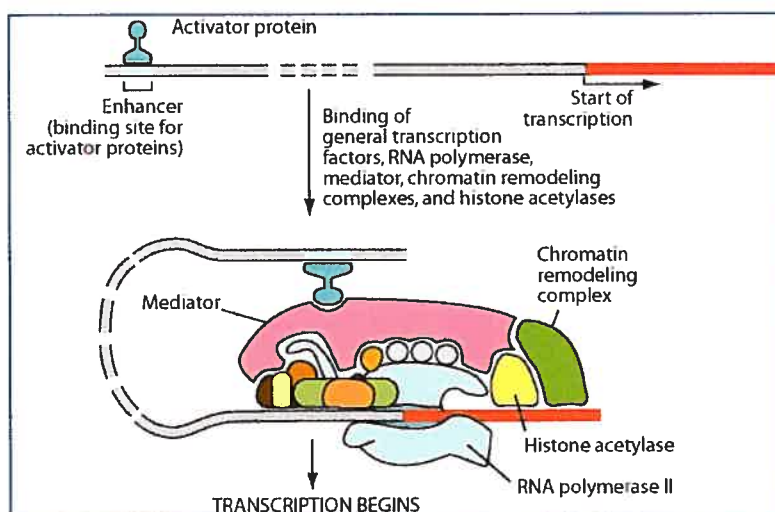
### 3.1.2.2. Les régions régulatrices

Comme nous venons de le voir, la région en contact direct avec un gène est le siège de la formation d'un complexe multiprotéique comprenant l'ARN pol. II et chargé d'initier la transcription de ce gène. Or de nombreuses études ont démontré que ce niveau « basal » de transcription ne permet d'expliquer les grandes quantités d'ARN messager produites dans une cellule. La présence d'un second type de régions, les régions régulatrices ou

séquences *cis*-régulatrices, permet au contraire d'expliquer ce phénomène. En effet, ces séquences en permettant la liaison de protéines activatrices, ou au contraire extinctrices (appelées facteurs *trans*-régulateurs), contrôlent l'activation de la transcription. Il semble désormais acquis que de telles séquences portent la responsabilité de l'expression «tissu-spécifique» et/ou temporelle des gènes (74-76).

La caractéristique principale de ces séquences est qu'elles peuvent se situer à de très grandes distances des gènes qu'elles régulent, comme c'est le cas par exemple du LCR, ou locus control region, du gène de la bêta-globine situé à plus de 20 kb en amont de ce dernier (77). Cependant d'autres caractéristiques surprenantes ont été découvertes concernant ces régions : elles sont actives quelque soit leur localisation, en amont, en aval ou même à l'intérieur des gènes qu'elles contrôlent et quelque soit leur orientation par rapport au gène (78).

Le mode d'action de ces séquences n'est pas totalement compris, mais il semble que, du fait de leur éloignement par rapport au gène, la molécule d'ADN forme une boucle afin de rapprocher les protéines liées sur cette séquence et les FT du complexe d'initiation liés au niveau du promoteur (Figure 16 Activation à distance des gènes par une séquence activatrice). Ces dernières années, ce type de séquence a fait l'objet de nombreuses recherches ce qui a permis l'identification et la caractérisation d'un très grand nombre de protéines régulatrices (79-82).



**Figure 16.** Activation à distance des gènes par une séquence activatrice

### 3.2. La transcription d'un gène de classe II

Comme il a été mentionné auparavant, la transcription est le premier niveau de contrôle de l'expression des gènes et les deux types de séquences introduites dans les parties précédentes participent activement à celle-ci (sections 3.1.2.1 et 3.1.2.2). Ce processus, indispensable à la survie de toute cellule, met en jeu différents complexes protéiques chargés d'initier la transcription en se liant à ces séquences particulières et peut être divisé en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Chacune de ces étapes a un rôle bien défini : l'initiation est l'étape d'assemblage de la machinerie protéique sur le promoteur et permet l'initiation de la formation du transcrit; l'élongation représente la phase d'allongement de ce transcrit et enfin la terminaison qui correspond au désassemblage des complexes protéiques. Cependant, l'étape essentielle est l'initiation dans la mesure où c'est à son niveau que va se décider si la transcription aura lieu ou non et c'est avec ses composantes que les régions régulatrices vont pouvoir interagir et contrôler la transcription.

#### 3.2.1. L'initiation

Pendant la phase d'initiation, se forme un complexe de pré-initiation, ou CPI, composé de facteurs généraux de transcription (FT) et de l'ARN polymérase II. Les facteurs généraux sont au nombre de six (TFIIA, B, D, E, F et H; exemple, TFIIA pour facteur de transcription A pour la polymérase II) et lient le promoteur suivant un ordre bien précis, (68, 70, 72, 83).

Les facteurs les plus importants sont les facteurs TFIID, TFIIB et TFIIF : les deux premiers cités sont en charge de reconnaître et lier la « boîte TATA » et le troisième lie et active l'ARN polymérase avant que celle-ci ne rejoigne le promoteur. En effet, TFIID, complexe protéique composé d'une sous-unité, la TBP (TATA box-binding protein), liant spécifiquement la séquence consensus de la boîte TATA, ainsi que de 13 autres protéines,

les TAFs (TBP-associated factors), est le premier facteur général de la transcription à se lier au promoteur (64). TFIIB est un simple polypeptide interagissant avec la TBP et le segment d'ADN amont dont le rôle est de stabiliser la fixation de TFIID (69, 84). Cependant, certains promoteurs possédant des boîtes TATA présentent immédiatement avant celle-ci l'élément BRE (TFIIB recognition element) chargé de faciliter la liaison du facteur TFIIB dans le complexe d'initiation et donc sa formation (85). Les autres facteurs sont moins importants du fait que leurs rôles semblent se limiter à stabiliser le complexe et donc à faciliter le recrutement successif des FT suivants (69). Les promoteurs ne possédant pas de boîte TATA mais un élément Inr ou un DPE, ou éventuellement les deux ensemble, lieront de la même manière les facteurs généraux de la transcription et le facteur TFIID. Cependant, plutôt que la TBP, il semble que des TAFs spécifiques de TFIID soient impliqués dans sa liaison au promoteur : par exemple TAF<sub>II</sub>150 et TAF<sub>II</sub>250 pour l'Inr, nouvellement renommés respectivement TAF2 et TAF1; et TAF<sub>II</sub>60 et TAF<sub>II</sub>40, renommés respectivement TAF6 et TAF9, pour le DPE (84, 86-88).

En définitive, quelque soit le type d'élément initiateur présent dans le cœur du promoteur, le mécanisme de la formation du complexe d'initiation ne varie pas : une fois le facteur TFIID lié, les autres composants vont s'assembler successivement les uns après les autres : tout d'abord TFIIA, puis TFIIB puis le complexe ARNpolIII-TFIIF, ensuite TFIIIE et enfin TFIIH (72). Préalablement à sa liaison au promoteur, l'ARN polymérase doit être « activée » par TFIIF; cette activation est en fait une liaison de sous-unités de TFIIH, Rap30 et Rap74, ce qui a pour but d'augmenter l'affinité de l'enzyme pour le complexe en formation (69) (Figure 17. La machinerie transcriptionnelle eucaryote page 48). Le rôle de la liaison de TFIIIE au complexe en cours de formation, est d'étendre la zone de contact entre l'ARN polymérase et l'ADN en aval (dans le sens 3') ce qui conduira à la libération de l'enzyme du complexe et au démarrage proprement dit de la transcription. Cependant, une autre étape-clé à la polymérisation de la molécule d'ARN est la phosphorylation de la polymérase par une sous-unité du facteur TFIIH qui est une protéine kinase : tant que la polymérase n'est pas sous une forme hyperphosphorylée, elle ne peut pas progresser le long

de la molécule d'ADN (89). Ce facteur intervient également à un autre niveau lors du processus de la transcription : de par ses propriétés hélicase, TFIIH permet le désappariement des deux brins d'ADN et donc la progression de l'ARN polymérase le long de l'ADN (90).

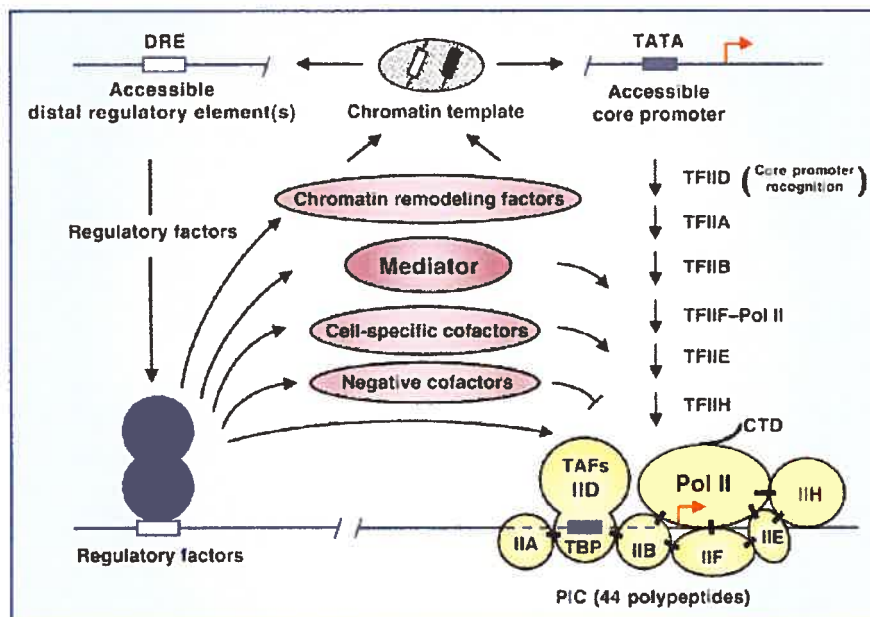


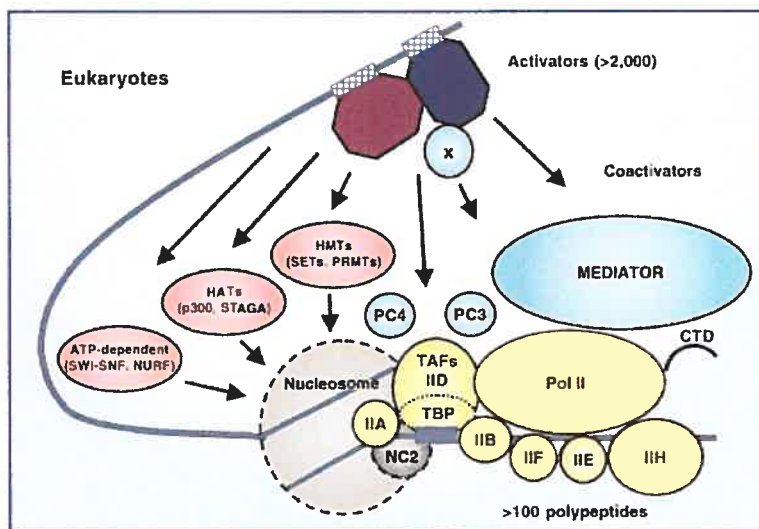
Figure 17. La machinerie transcriptionnelle eucaryote

### 3.2.2. L'élongation, la terminaison et la maturation du messager

Lorsque cet assemblage est terminé et que l'ARN polymérase a débuté la synthèse du brin d'ARN, le processus entre dans la phase d'élongation : l'ARN polymérase copie le brin d'ADN codant, ou brin sens, en ajoutant les nucléotides pour former un messager (91). Quand la polymérase atteint le site d'arrêt, ou codon stop, elle se détache de la matrice d'ADN et relâche un transcrit dit primaire (pré-ARNm) comportant à la fois la copie des régions codantes (exons) et des régions non codantes (introns) de l'ADN. Par la suite ce messager subira diverses opérations visant à le rendre mature :

- Excision des introns, ou épissage (92, 93);
- Ajout d'une coiffe à l'extrémité 5', ou « capping » : rôle important dans l'initiation de la traduction et dans la protection de la molécule d'ARNm contre les attaques de phosphatases et/ou de nucléases (94);
- Ajout d'une queue « polyA » à l'extrémité 3' : environ 250 nucléotides adénine sont ajoutés au transcrit primaire dont le rôle serait d'aider au passage de l'ARNm dans le cytoplasme et d'augmenter sa stabilité en le protégeant lors de la traduction (95, 96).

Il est à noter que ces deux derniers événements surviennent relativement tôt lors de la transcription. En effet, la fixation de la coiffe à l'extrémité 5' intervient avant même la fin de la transcription et l'ajout de la queue polyA a lieu dès qu'un facteur particulier, le CPSF (pour facteur spécifique du clivage et de la polyadénylation), reconnaît le site de polyadénylation à l'extrémité 3' du gène. De plus il faut remarquer que cette étape de polyadénylation n'est pas indépendante de la transcription. En effet, le facteur CPSF est recruté par TFIID au moment de l'initiation, avant même que celui-ci ne soit lié au complexe. Par la suite, lorsque l'ARN polymérase II démarre la transcription, le CPSF est transféré de TFIID à la polymérase qui le véhicule tout en transcrivant l'ARN. Lorsque la séquence de polyadénylation est synthétisée par la polymérase, le facteur CPSF s'y lie et la polyadénylation démarre (95, 96). Par la suite le messenger mature, ou ARNm, est exporté du noyau en direction du cytoplasme, et plus précisément dans le réticulum endoplasmique où il sera traduit en une protéine qui subira diverses modifications visant à la rendre fonctionnelle. Celle-ci, suivant sa « spécialisation » rejoindra le noyau si c'est un facteur de transcription ou une protéine régulatrice, la membrane cytoplasmique si c'est une protéine membranaire, comme l'AVPR2 par exemple, ou enfin restera dans le cytoplasme si c'est une protéine des ribosomes par exemple.



**Figure 18.** Représentation schématique du rôle des activateurs

# **Chapitre 4**

## Matériels et méthodes



Afin de confirmer l'hypothèse suivant laquelle les zones délétées chez les patients atteints de DIN lié à l'X joueraient un rôle dans l'activation de la transcription de l'*AVPR2* et porteraient la responsabilité de l'expression « tissu-spécifique » de l'*AVPR2*, il convient d'étudier en détail leur rôle. Les techniques ainsi que les expériences décrites dans ce chapitre doivent permettre une meilleure compréhension de ce phénomène. Cependant, devant la complexité des manipulations à réaliser, nous nous sommes d'abord focalisés sur la zone délétée de 102 pb en amont de l'*AVPR2*, appelée par la suite DE, pour distal element.

#### **4. Matériels et méthodes**

Les travaux effectués dans le but de comprendre le mécanisme de l'expression de l'*AVPR2* sont menés en étroite collaboration avec l'équipe du Dr. Rossert de l'Unité INSERM 356 de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris, France. L'ensemble des techniques et matériels tels que les protocoles et les lignées cellulaires nécessaires à ces expériences ont été gracieusement fournis par cette équipe.

##### **4.1. Lignées et culture cellulaires**

Le laboratoire du Dr. Rossert a mis au point différentes lignées cellulaires issues de cellules primaires de cortex de lapin présentant chacune des caractéristiques rénales ainsi qu'une grande facilité d'utilisation. Parmi cette large banque cellulaire, nous nous sommes limités à ne retenir pour nos manipulations que trois types cellulaires : des cellules présentant des caractéristiques de cellules principales du tubule collecteur, des cellules ayant des caractéristiques de cellules du tubule proximal et enfin une troisième lignée totalement différente sur le plan phylogénique, des fibroblastes.

#### 4.1.1. Cellules du tubule proximal

Lors de nos expériences, les cellules présentant des caractéristiques de cellules de tubule proximal, sont les cellules RC.SV1. L'équipe du Dr. Rossert a obtenu ces cellules suite à l'infection de cellules isolées de cortex de lapin par le virus simien 40 (SV40) de type sauvage. Celles-ci présentent toutes les caractéristiques des cellules du tubule proximal : présence de microvillosités à la membrane apicale, fortes expression d'hydrolases au niveau de la bordure en brosse, transport de glucose dépendant du sodium et enfin, production importante d'adénosine monophosphate cyclique, AMPc, suite à une stimulation par l'hormone parathyroïdienne, PTH. Il faut toutefois noter, que ces cellules, bien que ne devant pas exprimer les récepteurs V2, répondent malgré tout à une stimulation par l'agoniste de l'AVP, la dDAVP, par une légère accumulation d'AMPc (100). De par ces caractéristiques, l'utilisation de ces lignées devrait permettre de confirmer la présence de séquences spécifiques au tissu rénal, dans nos zones d'intérêt responsables de l'expression de l'*AVPR2*, ou effet «tissu-spécifique». Ces cellules seront appelées V11 par la suite.

#### 4.1.2. Cellules du tubule collecteur

La lignée cellulaire permanente RC.SVtsA58 utilisée dans cette étude est obtenue suite à l'infection de cellules tubulaires corticales isolées par le mutant tsA58 du virus SV40 sensible à la température. Le phénotype de ces cellules est le même que les cellules principales du tubule collecteur : elles expriment le récepteur V2 à leurs membranes, elles sont sensibles à l'AVP, elles expriment à leurs surfaces la molécule d'adhésion L1, elles répondent à une stimulation par la bradykinine, l'isoproterenol et les prostacyclines E2 (101-103). L'utilisation de cette lignée doit permettre de démontrer d'une part que, l'*AVPR2* est exprimé, et d'autre part que les zones étudiées présentent des séquences spécifiques responsables de cette expression dans les cellules du tubule collecteur, ou effet «cellule-spécifique». Ces cellules seront appelées par la suite V47.

#### 4.1.3. Lignée témoin

L'emploi d'une lignée cellulaire autre que rénale, en l'occurrence une lignée fibroblastique de type C<sub>3</sub>H 10T1/2, et pour cette raison nommée 10T1/2, s'explique par le fait que celle-ci ne présente aucune activité d'expression de l'*AVPR2* et que les séquences étudiées ne doivent avoir aucun effet sur l'expression du gène rapporteur.

#### 4.1.4. Culture cellulaire

Les cellules V47 sont cultivées et entretenues à 33°C : à cette température le génome du virus est exprimé et permet une croissance cellulaire rapide ainsi qu'une transformation du phénotype des cellules. En effet, celles-ci acquièrent toutes les caractéristiques des cellules du tubule collecteur à 33°C, qui correspond à la température permissive pour l'expression du génome viral, alors qu'à 39°C, température restrictive, les cellules retrouvent leur phénotype d'origine et cessent de se diviser. Les deux autres lignées, V11 et 10T1/2 sont cultivées quant à elles à 37°C (100, 101).

Les deux lignées de cortex rénal croissent dans un milieu défini afin de préserver leurs caractéristiques propres aux cellules du tubule collecteur, pour les V47, et aux cellules de tubule proximal pour les V11 (milieu DMEM -Dulbecco's modified Eagle's medium-enrichi) à 2% de sérum de veau foetal (SVF); la lignée de fibroblastes quant à elle est entretenue dans un milieu DMEM simple à 10% de SVF comme décrit par A. Calmont (65, 101). Les expériences de transfection ont lieu lorsque les cellules atteignent approximativement 70 à 80% de confluence (65).

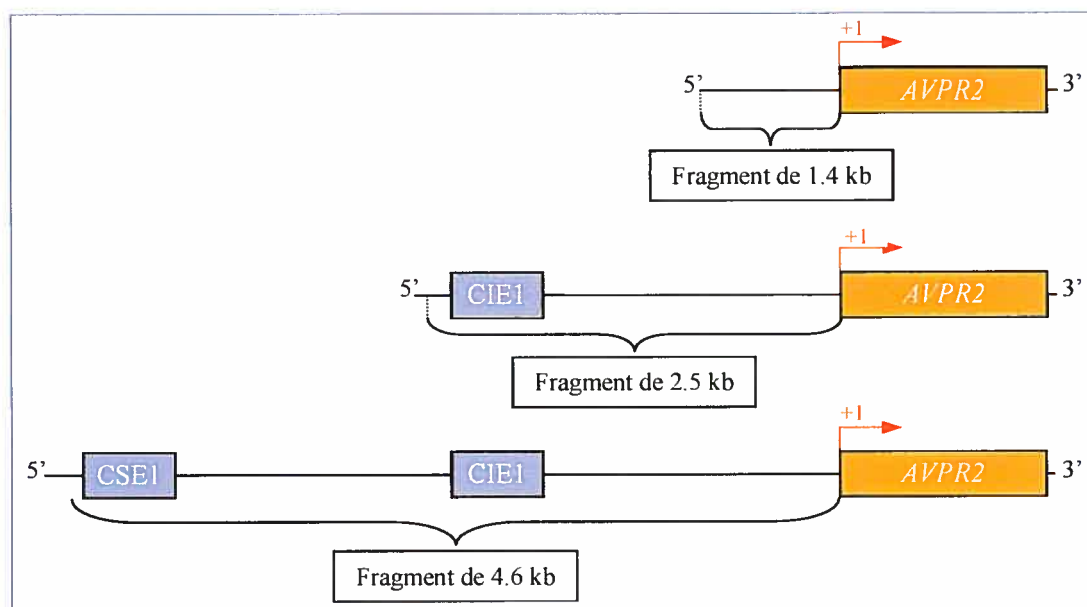
Chacune de ces lignées est transfectée par la séquence supposée activatrice de 102 pb ainsi que par différentes constructions de celle-ci présentant des séries de mutations.

## 4.2. Constructions

Deux types de constructions différentes ont été réalisées, la première devant démontrer l'effet du DE dans les lignées rénales versus la lignée fibroblastique, et la seconde visant à mettre en évidence, par des séries de mutations, une ou plusieurs séquence(s) à l'intérieur du DE responsable(s) de son effet éventuel dans la lignée V47. La première série de constructions a été réalisée dans le laboratoire du Dr. Rossert à Paris et la seconde dans le laboratoire du Dr. Bichet à Montréal. Comme il a été mentionné dans la section 2.2.2.3, le Dr Rossert a identifié deux zones participant à l'activation de l'*AVPR2*, CSE1 et CIE1. Par conséquent, nous devons tenir compte de ces zones dans nos constructions, afin de voir une éventuelle coopération entre ces zones et notre DE.

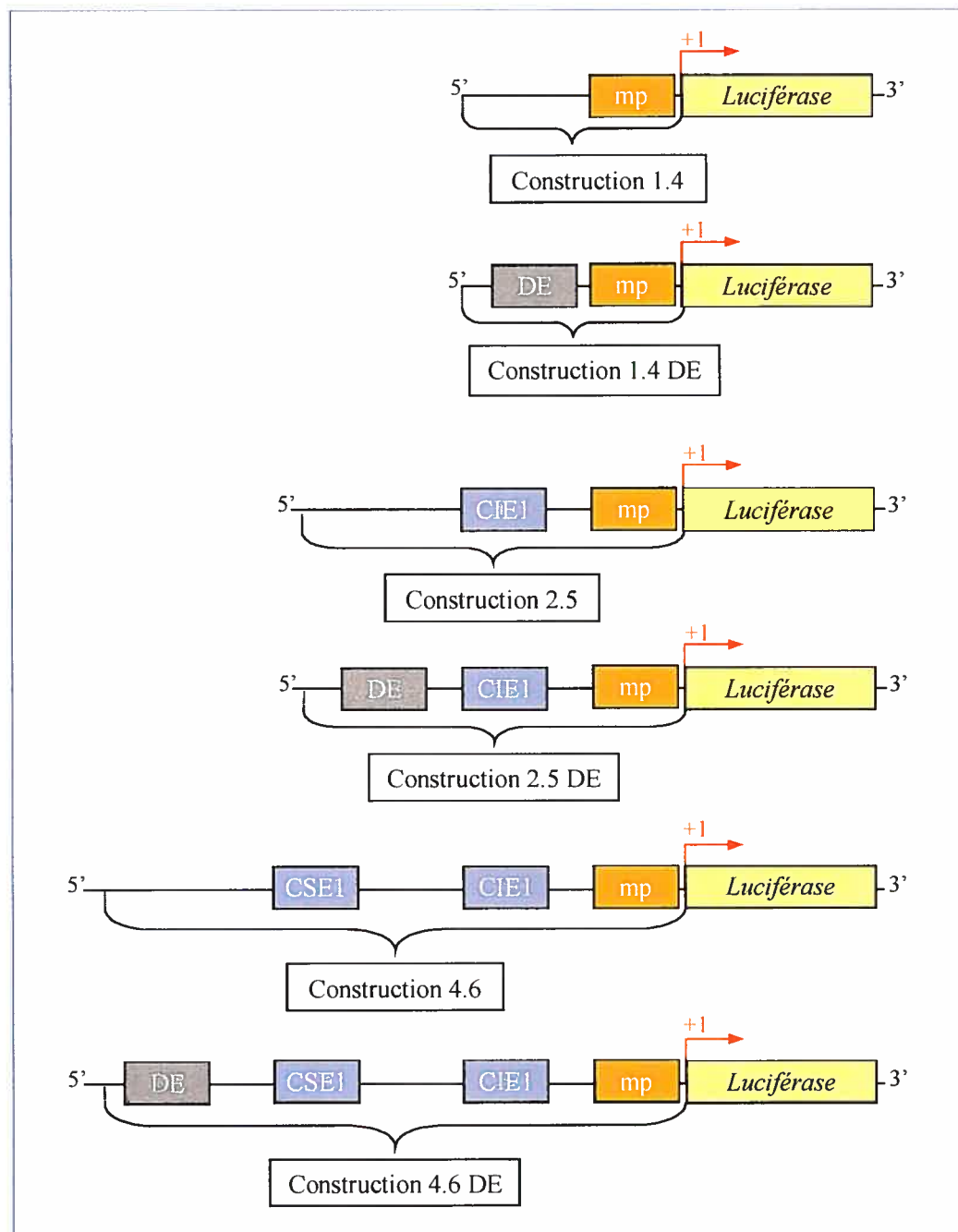
### 4.2.1. Constructions pour étudier l'effet de l'élément distal

Afin de démontrer que le DE est impliqué dans l'activation de la transcription de l'*AVPR2*, nous avons réalisé deux types de constructions : un vecteur d'expression contenant cet élément et l'autre en étant dépourvu. Comme précisé ci-dessous, chacune de ces constructions comporte en plus du DE trois zones différentes correspondant à CSE1 et CIE1, fragment de 4.6 kb; CIE1 seul, fragment de 2.5 kb; et enfin une zone sans CSE1 ni CIE1, fragment de 1.4 kb (Figure 19. Représentation schématique des fragments utilisés dans l'étude de l'expression de l'*AVPR2* page 56). Les contrôles correspondent aux constructions dépourvues du DE : 4.6 seul, 2.5 seul et 1.4 seul.



**Figure 19.** Représentation schématique des fragments utilisés dans l'étude de l'expression de l'*AVPR2*

La zone correspondant au DE est obtenue à partir du cosmide Qc7c1, qui contient un insert d'environ 19kb en amont du premier exon de l'*AVPR2* et 18 kb en aval de ce gène, grâce à une double digestion enzymatique. Ce fragment est ensuite amplifié par PCR avec un couple d'amorces spécifiques. Dans le même temps, les fragments de 4.6, 2.5 et 1.4 kb sont obtenus par des séries de digestions du cosmide Qc7c1, puis amplifiés par PCR. Le DE obtenu est ensuite cloné en amont de chacun des fragments de 4.6, 2.5 et 1.4 kb dans un vecteur intermédiaire, puis l'ensemble est incorporé dans un vecteur d'expression contenant le gène de la luciférase, ou gène rapporteur, le plasmide, pLuc5m (65, 104) et données non publiées. Les vecteurs obtenus sont les suivants : pLuc 1.4 avec et sans DE; pLuc 2.5 avec et sans DE et enfin pLuc 4.6 avec et sans DE. Les constructions pLuc 1.4, pLuc 2.5 et pLuc 4.6 sans DE correspondent aux contrôles utilisés dans chaque expérience de transfection (Figure 20. Représentation schématique de différentes constructions clonées dans le vecteur d'expression page 57).



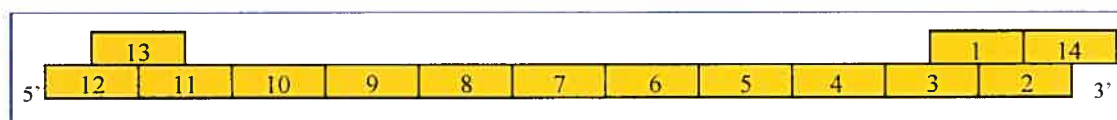
**Figure 20.** Représentation schématique des différentes constructions clonées dans le vecteur d'expression. CSE1: Collecting duct stimulatory element 1; CIE1: Collecting duct inhibitory element 1; m.p.: promoteur minimal de l'*AVPR2*

#### 4.2.2. Constructions visant à localiser une zone spécifique dans l'élément distal

Après avoir démontré l'effet du DE dans l'expression du gène rapporteur, et donc de l'*AVPR2*, dans les différentes lignées cellulaires, nous nous sommes attachés à identifier dans ces 102 pb une ou plusieurs séquence(s) responsable(s) de l'effet observé.

Pour ce faire nous avons « découpé » notre zone de 102 pb en 14 zones de 10 pb :

- 11 zones correspondant au DE en lui-même, notées de 2 à 12;
- 2 zones correspondant aux points de cassures en 5' et 3' de la délétion notées respectivement 13 et 14;
- Et enfin une zone correspondant à une séquence similaire à CSE1, notée 1 (Figure 21. Série de mutations à l'intérieur du DE).



**Figure 21.** Série de mutations à l'intérieur du DE

Chacune de ces zones fait ensuite l'objet de mutations affectant chaque base afin d'empêcher la fixation d'une protéine éventuelle. Cette mutation consiste en la création d'un site enzymatique, par exemple PstI dans l'exemple ci-dessous, afin de contrôler sa présence par digestion enzymatique. De plus chaque mutation est vérifiée une seconde fois par séquençage (Figure 22. Exemple de mutations affectant la zone 6 du DE).

Séquence de la zone 6 du DE : 5'-TAGGTACCGA-3'

Séquence de la zone 6 après mutation : 5'-CCCTGCAGTG-3'

Site enzymatique créé : site de coupure par PstI : CTGCAG

**Figure 22.** Exemple de mutations affectant la zone 6 du DE

L'ensemble de ces constructions a été obtenue par PCR (mutagenèse dirigée), à partir du vecteur pLuc 1.4DE normal, c'est-à-dire contenant la zone amont de l'*AVPR2* de 1.4 kb et le DE dans sa forme normale. Puis le DE dans sa forme mutée est digéré et cloné dans pLuc 1.4 et dans pLuc 4.6 afin d'obtenir pLuc1.4DEm et pLuc 4.6DEm. Nous obtenons donc 13 constructions différentes appelées 1.4DE2m (notée DE2m) jusqu'à 1.4DE14m (notée DE14m). Il faut noter que devant les résultats obtenus suite aux expériences menées à Paris, la construction contenant la zone de 2.5 kb n'a pas été jugée indispensable (section Résultats).

### 4.3. Expériences de transfections transitoires

Chacune des lignées cellulaires, V47, V11 et 10T1/2 est transfectée avec chacune des constructions, de la première série, correspondant au DE normal, ou de la seconde, correspondant aux mutations de DE.

Un jour avant la transfection, nous répartissons 200 000 cellules par puits dans une plaque à 6 puits. La transfection est réalisée suivant le protocole établi par A. Calmont (65). Brièvement, chaque puits « reçoit » un mélange, composé du milieu spécifique à chaque lignée, de 900 nanogrammes (ng) d'ADN de chaque construction, 50 ng du vecteur de normalisation, pSV- $\beta$ -galactosidase, et de 4  $\mu$ l de lipofectamine (*Invitrogen*). Afin d'augmenter l'efficacité des transfections, 6  $\mu$ l par puits de Plus Reagent (*Invitrogen*) sont ajoutés au milieu. Trois heures après la transfection les milieux sont changés. L'expression du gène rapporteur est mesurée 48 heures après le début de la transfection. Les cellules sont lavées au PBS, grattées et décollées des puits puis lysées par cycles de congélation/décongélation dans un tampon phosphate.

Les activités luciférase sont mesurées en utilisant un luminomètre Tropic TR 717/Winglow (*EG&G Berthold*). L'extrait cellulaire est mis en présence de D-Luciférine (*Roche*) et l'émission du flash lumineux est mesurée suivant un mode d'intégration sur un délai de 10 secondes (65, 104).



L'activité  $\beta$ -galactosidase est utilisée pour corriger l'efficacité de la transfection. La mesure de cette activité repose sur une réaction colorimétrique entre l'enzyme, la  $\beta$ -galactosidase et le substrat, la résorufine  $\beta$  D-galactopyrannoside (*Sigma*). Lorsqu'un changement de coloration apparaît, la mesure spectrométrique est réalisée à 562nm grâce à un lecteur de microplaque standard (EL 800 *Bio-TEK instrument, Inc*) (65, 105).

Chaque expérience de transfection est réalisée en triplicata et répétée entre 3 et 6 fois; les contrôles sont répétés à chaque expérience. Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne des séries de mesures +/- la déviation standard (SD). De plus ces résultats sont présentés sous deux formes, une forme brute traduisant les activités de chaque constructions dans les trois lignées les unes par rapport aux autres et une forme relative où les activités sont rapportées au contrôle dont l'expression est arbitrairement fixé à 100%. Cette dernière forme, dans le cas des mesures des activités « individuelles » des 14 séries de mutations, ne peut pas présenter de déviations standard dans la mesure où c'est l'activité moyenne de chaque mesure qui est rapportée à la moyenne du contrôle. Il n'y a donc qu'une seule valeur. En outre la valeur statistique des mesures de chaque constructions du DE muté 10 pb par 10 pb dans chacune des lignées cellulaires est obtenue suivant le test *t* de Student avec une correction de Bonferroni (106) (Section 5.2.6. Récapitulatif des résultats obtenus dans les trois lignées cellulaires page 76)

# **Chapitre 5**

## **Résultats et discussions**

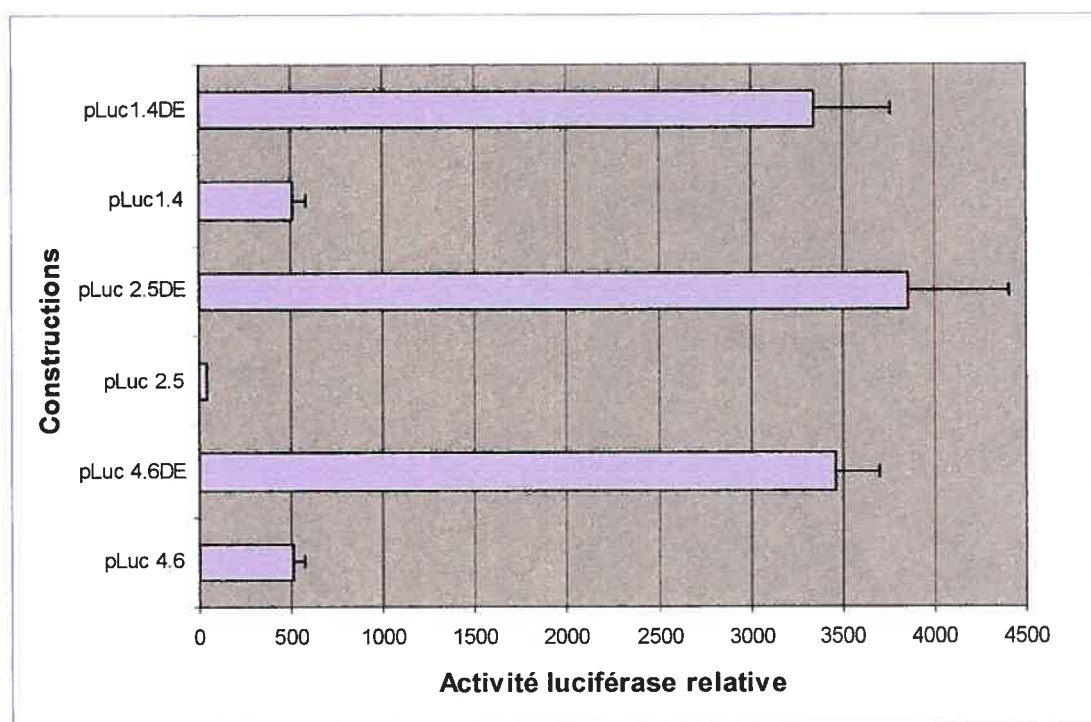
## 5. Résultats et discussions

La partie résultats se présente suivant deux volets : le premier est issu des expériences réalisées dans le laboratoire du Dr. Rossert à Paris et vise à démontrer l'effet «tissu-spécifique» du DE; et le second, réalisé à Montréal dans le laboratoire du Dr. Bichet vise à caractériser plus précisément la ou les zone(s) du DE responsable(s) de cet effet, et éventuellement à localiser une zone responsable de l'effet «cellule-spécifique». Les discussions propres à chaque résultat sont exposées à la suite de ceux-ci.

### 5.1. Effet de l'élément distal

Comme mentionné dans la partie consacrée aux constructions, section 4.2, le DE a été cloné en amont de différentes séquences amont du gène de l'*AVPR2* dans le vecteur d'expression pLuc; les contrôles correspondant aux mêmes constructions dépourvues du DE. Par la suite, chaque construction a été introduite dans les trois lignées cellulaires. Les variations d'activités luciférase observées entre les constructions contenant le DE et les constructions sans le DE correspondent donc à un effet direct du DE sur l'expression du gène rapporteur. Dans cette série de mesures, les résultats sont donnés uniquement sous forme brute et non rapportés au contrôle : ceci s'explique simplement par le fait que les variations d'expression sont, d'une part, suffisamment importantes et d'autre part, que les variations observées entre les différentes mesures ne remettaient pas en cause l'impact du DE.

### 5.1.1. Effet de l'élément distal dans les cellules du tubule collecteur (V47)



**Graphique 1.** Effet du DE dans les cellules V47. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de chaque triplicata +/- SD.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons observer que le DE entraîne une augmentation de l'expression du gène rapporteur et ce, quelle que soit la taille de la séquence amont de l'*AVPR2* clonée en aval. En effet, dans le cas de la séquence de 4.6 kb, qui contient les éléments CSE1 et CIE1, identifiés par l'équipe du Dr. Rossert et respectivement activateur et inhibiteur de l'expression «tissu-spécifique» de l'*AVPR2* (voir (65) et section 2.2.2.3. Le promoteur de l'*AVPR2*), l'augmentation d'expression est de plus de 7 fois par rapport au contrôle sans le DE. Dans le cas de la construction avec la séquence 2.5 kb, c'est-à-dire sans CSE1 mais avec CIE1, l'augmentation est encore plus significative car celle-ci est de plus de 100 fois par rapport au contrôle. Et enfin dans le cas où la

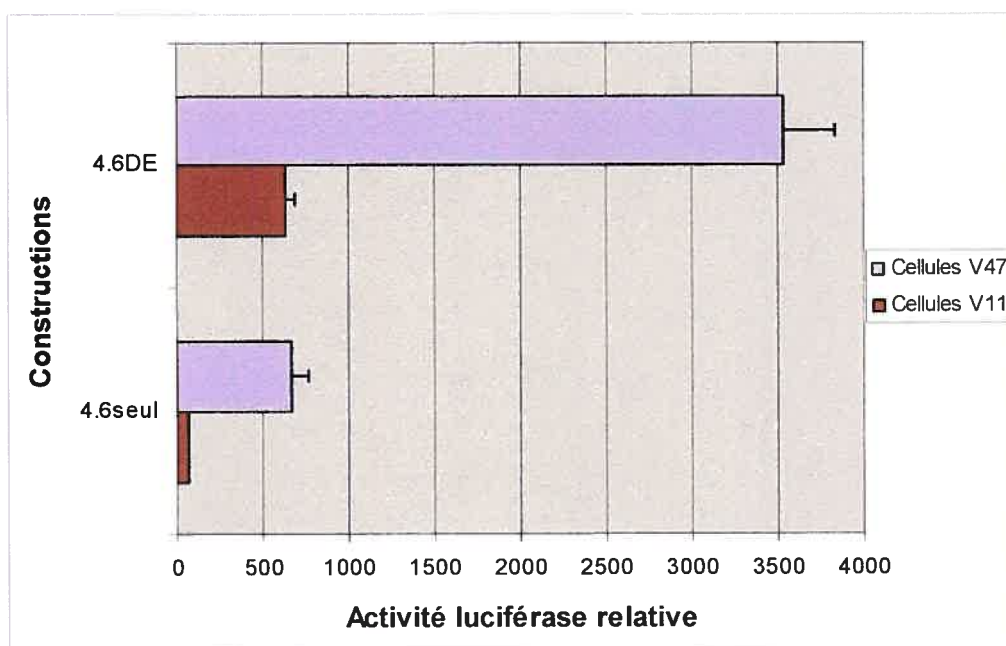
séquence ne contient ni CIE1 ni CSE1, séquence de 1.4 kb, l'augmentation est de plus de 6 fois.

Au vue de ces premiers résultats, plusieurs conclusions peuvent d'ores et déjà être énoncées. Le premier point concerne l'effet intrinsèque du DE dans les cellules du tubule collecteur. Il semble évident que cette zone joue un rôle dans l'expression du gène rapporteur, et donc du gène de l'*AVPR2*, puisque son absence entraîne une diminution du niveau d'expression d'au minimum 6 fois par rapport à la construction pourvue du DE. Le second point important est que l'effet du DE n'est en aucune façon lié aux éléments identifiés par le Dr. Rossert : que le DE soit cloné en amont de l'ensemble CSE1-CIE1 (construction pLuc 4.6), de CIE1 seul (construction pLuc 2.5) ou d'aucun des deux (construction pLuc 1.4), son effet activateur est présent. Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'on regarde l'effet dans la construction contenant l'élément inhibiteur CIE1, pLuc 2.5 : l'augmentation est de plus de 100 fois par rapport au contrôle. Par conséquent il ne semble pas y avoir de coopération entre le DE et les éléments CSE1 et CIE1.

Devant ces premières constatations se pose une question importante, est-ce que le DE a le même effet dans les autres lignées cellulaires ?

### 5.1.2. Comparaison de l'effet de l'élément distal dans les cellules du tubule collecteur (V47) et les cellules du tubule proximal (V11)

Devant l'observation précédente suivant laquelle l'effet du DE n'est influencé ni par CSE1 ni par CIE1 les expériences suivantes ont été réalisées uniquement avec la construction pLuc 4.6. Cependant il serait intéressant de faire ultérieurement ces expériences avec les constructions contenant les fragments 1.4 et 2.5 kb.



**Graphique 2.** Comparaison de l'effet du DE dans les cellules V47 et les cellules V11. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de chaque triplicate  $\pm$  SD.

D'après ce graphique nous pouvons discerner deux points importants. Le premier est que l'effet du DE observé lors de la première mesure avec la construction 4.6 DE se confirme : les résultats précédents montraient une augmentation du niveau d'expression de l'ordre de 7 fois par rapport au contrôle dans les cellules du tubule collecteur et cette fois-ci l'augmentation est de plus de 5 fois. Ensuite, nous pouvons voir que l'effet du DE observé

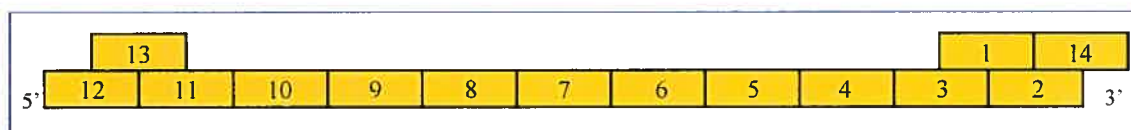
précédemment dans les cellules de tubule collecteur se confirme dans les cellules du tubule proximal. En effet, dans ces dernières, la présence du DE entraîne une augmentation de quasiment 10 fois par rapport au contrôle, ce qui laisse supposer que le DE aurait un rôle plus important dans cette lignée. Il faut tout de même noter que le niveau d'expression dans cette lignée du tubule proximal est beaucoup moins important que dans la lignée du tubule collecteur : niveau d'expression de base respectivement d'environ 60 contre 670 d'activité luciférase sans le DE et 600 contre 3500 dans les constructions contenant le DE.

Il est important de noter que des résultats totalement différents ont été obtenus avec les fibroblastes (données non disponibles). Malheureusement lors de mon séjour dans le laboratoire du Dr. Rossert nous n'avons pas eu le temps de réaliser ces mesures avant mon départ. Cependant les résultats obtenus par les Drs. Rossert et Ribes démontrent que le DE n'a absolument aucun effet sur l'expression du gène rapporteur dans cette lignée.

Trois conclusions importantes peuvent être tirées de cette première série d'expériences. Tout d'abord, nous avons démontré que la présence du DE entraînait une augmentation considérable de l'expression du gène rapporteur (entre 6 et 100 fois en fonction de la lignée cellulaire rénale utilisée). Ensuite, nous avons établi que le DE exerçait son effet indépendamment de l'une ou l'autre des séquences identifiées précédemment par le Dr. Rossert. Il n'y a donc aucun phénomène de coopération entre le DE et ces éléments, CSE1 et CIE1. Enfin, ces expériences nous ont permis de mettre en évidence un effet «tissu-spécifique» du DE. En effet, ce dernier exerce une action importante dans les différentes lignées du tissu rénal, cellules du tubule collecteur et cellules du tubule proximal, mais n'en n'a aucune dans les fibroblastes. Il faut à présent étudier plus en détail le DE afin de localiser une ou plusieurs zone(s) responsable(s) de cet effet «tissu-spécifique».

## 5.2. Étude détaillée de l'élément distal

Afin d'identifier une ou plusieurs zones spécifiques à l'intérieur du DE qui sont responsables de l'effet observé dans les cellules rénales, nous avons réalisé des séries de 14 mutations de 10 pb chacune de l'ensemble de la séquence (section 4.2.2 Constructions visant à localiser une zone spécifique dans le DE et figure 23). De la même manière que précédemment, nos 14 séries de mutations ont été clonées en amont de séquences amont du gène de l'*AVPR2* puis les trois lignées cellulaires ont été transfectées. Cependant, et pour les mêmes raisons qui ont été évoquées dans la section 5.1.2 *Comparaison de l'effet de l'élément distal dans les cellules V47 et les cellules V11*, pour ces expériences nous avons effectué nos mesures avec la zone de 1.4 kb.

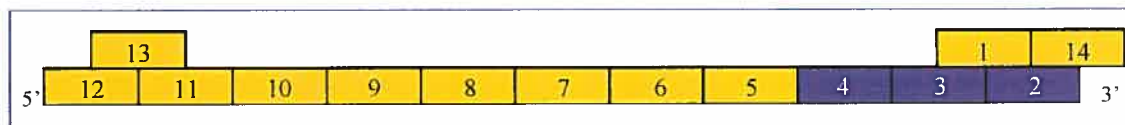


**Figure 23.** Série de mutations à l'intérieur du DE

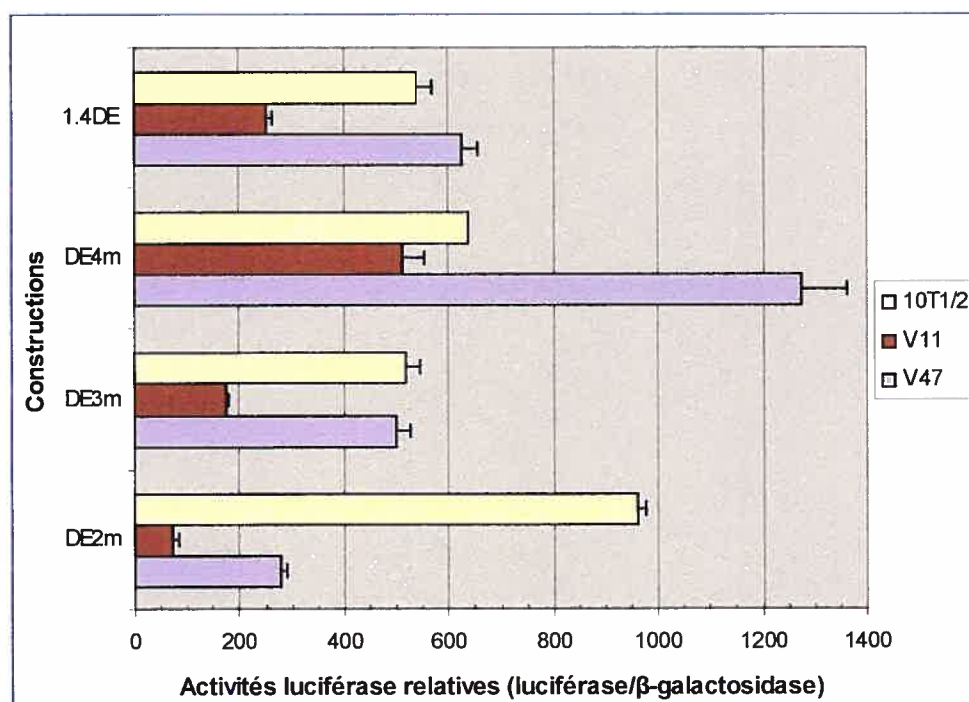


### 5.2.1. Étude des mutations DE2m à DE4m

Comme figuré sur la représentation schématique du DE, les trois premières séries de mutations portent sur la zone amont du point de cassure à l'extrémité 3'.



**Figure 24.** Mutations DE2m, DE3m et DE4m à l'intérieur du DE

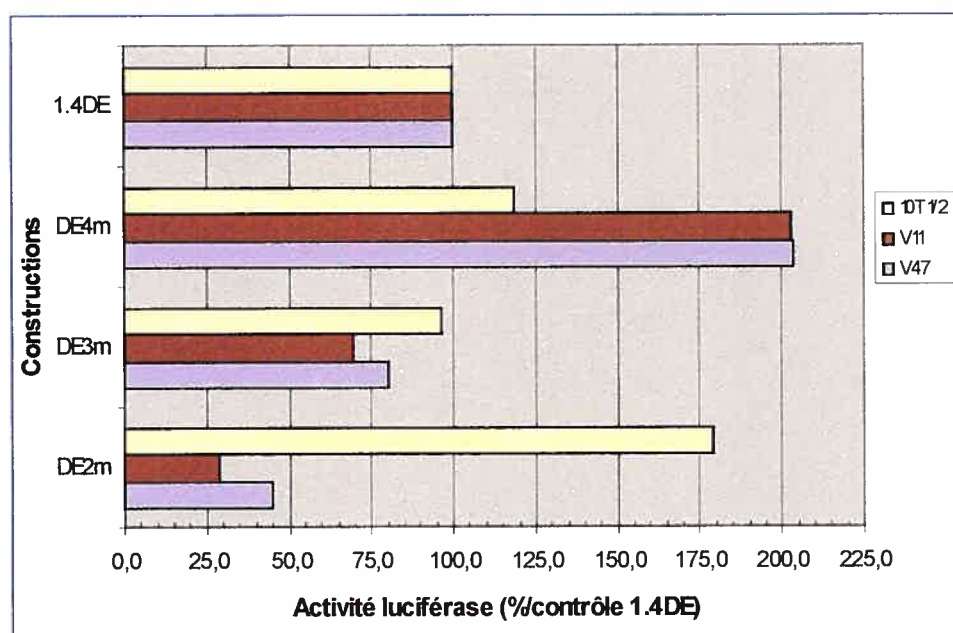


**Graphique 3.** Effet des mutations DE2m, DE3m et DE4m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires. Les valeurs indiquées représentent la moyenne d'un triplicata d'une seule série de mesure +/- SD.

D'un point de vue général, les deux lignées rénales présentent un profil similaire : la mutation DE4m semble avoir créé un site activateur (niveau d'expression plus que doublé par rapport au contrôle), DE3m présente à peu près le même niveau que le contrôle et le

niveau d'expression induit par DE2m est fortement réduit. Les effets de ces mêmes mutations engendrent des résultats totalement différents dans les fibroblastes : DE4m est identique, DE3m est quasiment identique et DE2m fortement augmenté par rapport au contrôle. Ceci confirme l'idée suivant laquelle le DE a un effet «tissu-spécifique».

Afin de se faire une idée plus précise quant aux variations d'expression réelles, il faut rapporter chaque valeur pour chaque lignée cellulaire à son propre contrôle. Pour ce faire, nous fixons la valeur de ces contrôles à 100% d'activité et nous comparons ainsi les variations entre chaque construction. Cependant, la valeur rapportée au contrôle étant la moyenne de chaque triplicate, il n'y a qu'une seule donnée et par conséquent aucune déviation standard, ni statistiques. Celles-ci sont exposées dans les graphiques récapitulatifs de toutes les séries de mesures effectuées sur chacune des 3 lignées cellulaires (voir section 5.2.6.1, 5.2.6.2 et 5.6.6.3).

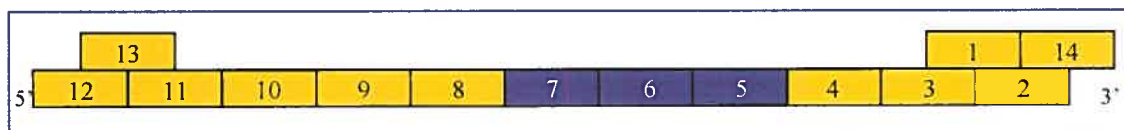


**Graphique 4.** Effet des mutations DE2m, DE3m et DE4m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires. Les résultats sont la valeur moyenne de chaque triplicate par rapport à la moyenne du triplicate du contrôle fixée à 100%. Aucun test statistique n'est réalisé.

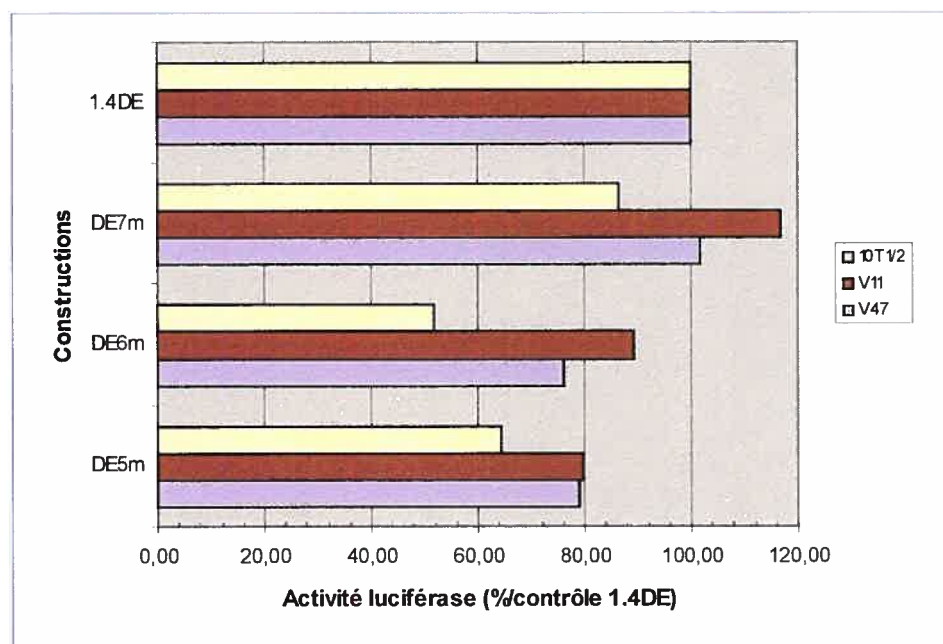
Comme nous pouvons le voir sur ce graphique, les variations observées précédemment se confirment. Cependant cette représentation des résultats permet de mieux distinguer les variations d'expression et ainsi d'avoir une idée plus précise du rôle de chaque zone étudiée : le fait de muter les 10 premières bases à l'extrémité 3' du DE entraîne une chute de 70% de l'activité de base dans les cellules du tubule proximal (V11) et de « seulement » 50% dans les cellules du tubule collecteur (V47). Ce qui permet d'avancer l'hypothèse suivant laquelle cette première zone identifiée lierait non pas un élément activateur spécifique des cellules du tubule collecteur, et donc responsable de l'expression de l'*AVPR2* dans ces cellules, mais plutôt un élément activateur retrouvé dans toutes les lignées rénales et par conséquent non spécifique à l'*AVPR2*. La zone 3 présente un niveau d'expression proche du contrôle (75% dans les cellules du tubule collecteur et 70% dans les cellules du tubule proximal) et la zone 4 quant à elle révèle une augmentation flagrante du niveau d'expression par rapport au contrôle (plus de 100%). Les valeurs d'expression obtenues dans les fibroblastes sont totalement différentes mais similaires à ce qui a été décrit précédemment.

Par la suite, étant donné que le modèle des expressions rapportées au contrôle permet une meilleure « lisibilité » ainsi qu'une vision plus juste des variations d'expression, l'ensemble des résultats sera donc donné suivant ce modèle.

### 5.2.2. Étude des mutations DE5m à DE7m



**Figure 25.** Mutations DE5m, DE6m et DE7m à l'intérieur du DE

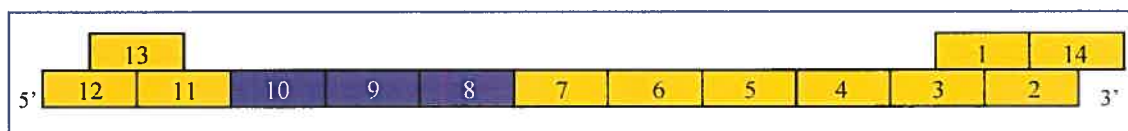


**Graphique 5.** Effet des mutations DE5m, DE6m et DE7m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires. Les résultats sont la valeur moyenne de chaque triplicata par rapport à la moyenne du triplicata du contrôle fixée à 100%. Aucun test statistique n'est réalisé.

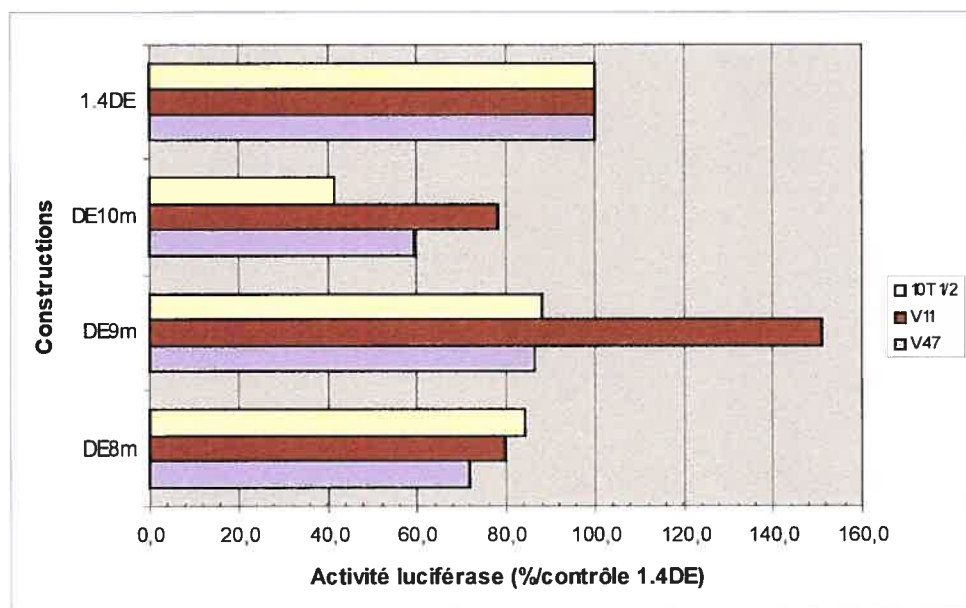
Comme nous pouvons le constater sur ce graphique, le fait de muter les zones 5, 6 et 7 n'entraîne aucune chute notable de l'expression du gène rapporteur : DE5m présente pratiquement 80% de l'activité du contrôle dans les deux lignées du tissu rénal; DE6m montre des activités de 76 et 88% dans les cellules du tubule collecteur et du tubule proximal respectivement et enfin DE7m ne modifie pas, excepté une légère augmentation, l'activité par rapport au contrôle et ce dans les deux lignées. Pour ce qui est des

fibroblastes, les mutations entraînent dans les trois cas des chutes de l'expression dont une plus importante pour DE6m; cependant, les variations observées dans cette lignée ne présentent aucune similitude avec les observations décrites dans les lignées rénales.

### 5.2.3. Étude des mutations DE8m à DE10m



**Figure 26.** Mutations DE8m, DE9m et DE10m à l'intérieur du DE

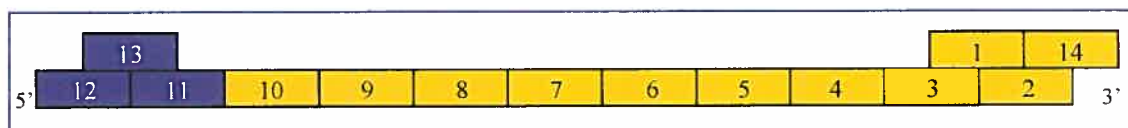


**Graphique 6.** Effet des mutations DE8m, DE9m et DE10m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires. Les résultats sont la valeur moyenne de chaque triplicata par rapport à la moyenne du triplicata du contrôle fixée à 100%. Aucun test statistique n'est réalisé.

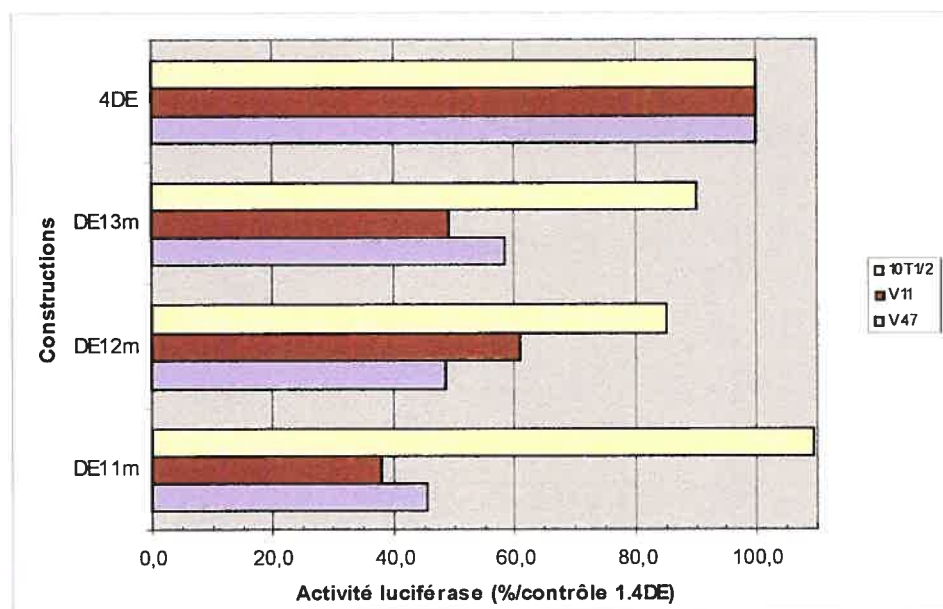
Dans les cellules du tubule collecteur, le fait de muter les zones 8, 9 et 10 entraîne une diminution du niveau de l'expression de respectivement, 28, 15 et 41%. Ces mêmes mutations, excepté celles de la zone 9 qui montre une forte augmentation d'environ 50%, révèlent le même profil, cependant moins accentué, dans les cellules du tubule proximal :

diminution de l'ordre de 21% pour la zone 8 et 23% pour la zone 10. Ce qui conduit à émettre l'hypothèse suivant laquelle la zone 10 pourrait éventuellement jouer un rôle dans les cellules du tubule collecteur mais pas dans les cellules du tubule proximal. Cette hypothèse est malheureusement rendue caduque par les résultats observés dans les fibroblastes. En effet, les trois types de mutations entraînent des chutes du niveau d'expression dans cette lignée mais ceci est surtout vrai pour la zone 10 dont le niveau d'expression est diminué d'environ 40% par rapport au contrôle.

#### 5.2.4. Étude des mutations DE11m à DE13m



**Figure 27.** Mutations DE11m, DE12m et DE13m à l'intérieur du DE



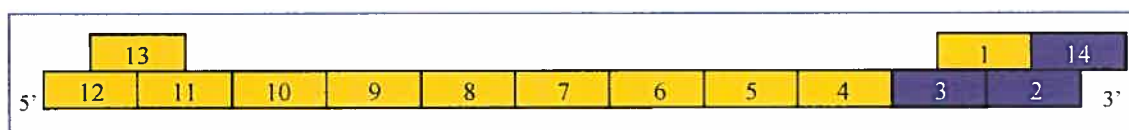
**Graphique 7.** Effet des mutations DE11m, DE12m et DE13m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires. Les résultats sont la valeur moyenne de chaque triplicata par rapport à la moyenne du triplicata du contrôle fixée à 100%. Aucun test statistique n'est réalisé.

D'après ces résultats, nous pouvons voir que dans les cellules du tubule collecteur les deux zones mutées situées à l'extrémité 5' du point de cassure du DE, zones 11 et 12, entraînent une chute importante du niveau de l'expression, respectivement de 55 et 50%. La zone 13, qui correspond à une séquence chevauchant les zones 11 et 12, quant à elle semble engendrer une chute mais beaucoup moins importante, d'environ 42%. Des chutes similaires sont observées dans les cellules du tubule proximal. Les fibroblastes quant à eux ne semblent pas affectés par ces mutations puisque dans un cas, zone 11, l'expression est plus élevée que celle du contrôle et dans les zones 12 et 13 les chutes ne sont que de 10 et 15% respectivement. Par conséquent il semble que l'extrémité 5' comporte une zone étendue d'environ 30 pb impliquée dans l'expression du gène rapporteur.

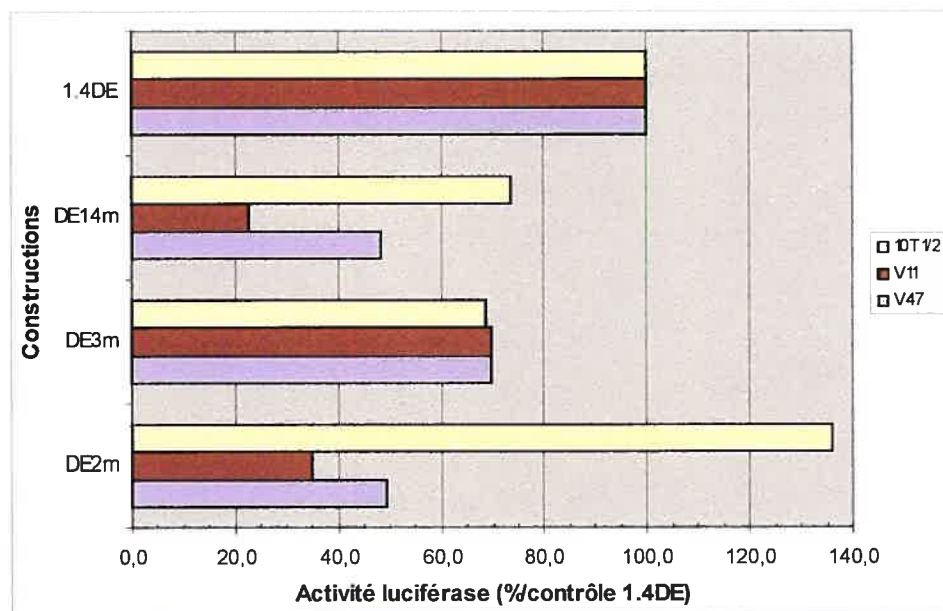


### 5.2.5. Étude des mutations DE2m, DE3m et DE14m

Afin d'étudier l'effet des mutations de la zone 14, qui correspond à la zone chevauchant le point de cassure en 3', nous avons refait en parallèle la mesure de la zone commune à celle-ci, la zone 2. L'étude précédente de la zone 3 révélait une diminution du niveau d'expression par conséquent nous avons également refait la mesure de cette dernière.



**Figure 28.** Mutations DE2m, DE3m et DE14m à l'intérieur du DE



**Graphique 8.** Effet des mutations DE2m, DE3m et DE14m sur l'expression du gène rapporteur par rapport aux contrôles 1.4DE dans les 3 lignées cellulaires. Les résultats sont la valeur moyenne de chaque triplicata par rapport à la moyenne du triplicata du contrôle fixée à 100%. Aucun test statistique n'est réalisé.

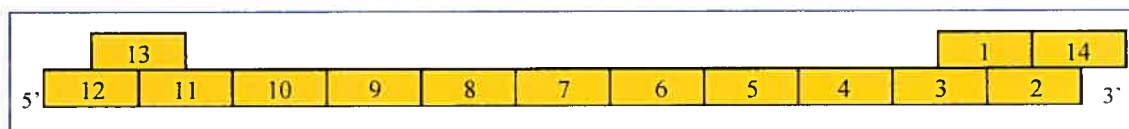


D'après les résultats obtenus, il semble que la mutation de la zone 14 entraîne une chute importante du niveau de l'expression et ce dans les deux lignées rénales. Cependant il apparaît clairement que cette diminution est plus importante dans les cellules du tubule proximal : la chute est d'environ 77% dans ces cellules alors que dans la lignée du tubule collecteur celle-ci n'est que d'environ 52%. Des résultats similaires sont obtenus avec l'étude de la zone 2 : environ 65% de chute dans les cellules du tubule proximal contre environ 42% dans la lignée du tubule collecteur. La zone 3 quant à elle démontre des niveaux d'expression quasiment identiques à ceux observés précédemment (section 5.2.1 Étude des mutations DE2m à DE4m) : des chutes d'expression d'environ 30% sont observées dans les deux lignées rénales. Devant ces résultats nous pouvons donc confirmer l'hypothèse suivant laquelle cette zone chevauchant le point de cassure en 3' serait impliquée dans l'effet du DE observé précédemment (sections 5.2.1 et 5.2.2). Cependant il semble évident que cette zone ne porte pas la responsabilité de l'expression cellule spécifique de l'*AVPR2* dans les cellules du tubule collecteur, mais servirait plutôt à la fixation d'un élément activateur retrouvé dans toutes les lignées rénales et par conséquent non spécifique à l'*AVPR2*.

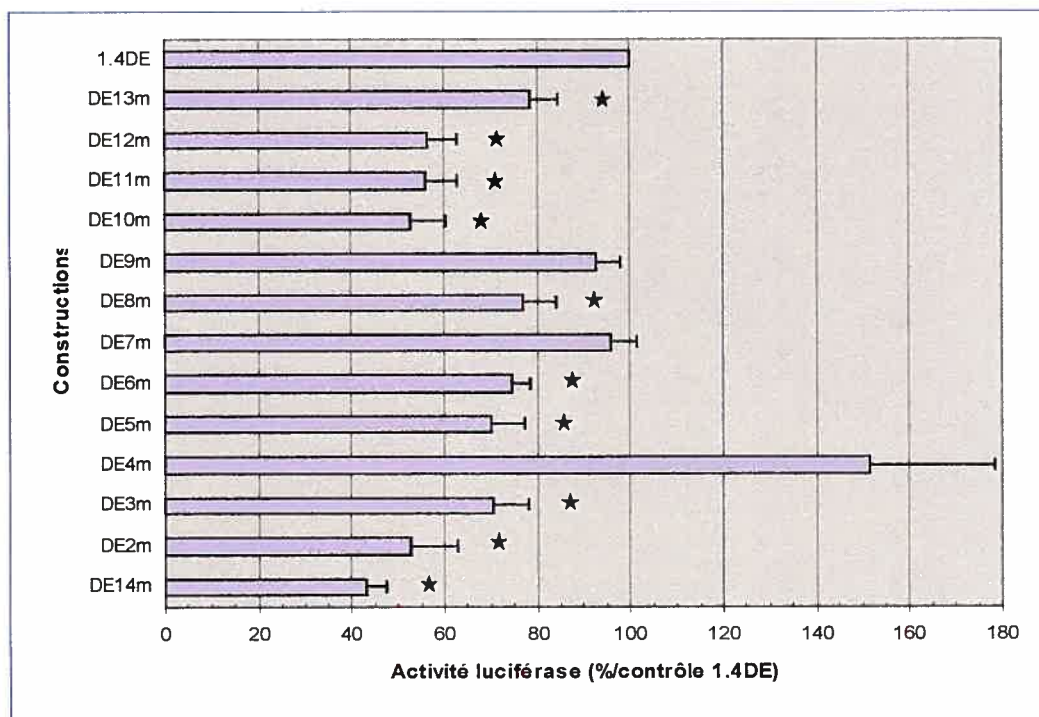
#### 5.2.6. Récapitulatifs des résultats obtenus dans les trois lignées cellulaires

À présent, nous allons présenter les 5 séries de mesures effectuées sur ces 13 zones. Ces résultats sont donnés sous forme de graphiques distincts pour chaque lignée cellulaire afin d'avoir une vision d'ensemble des rôles de chacune des zones étudiées. De la même manière que précédemment, les valeurs d'expression sont rapportées au contrôle interne à chaque lignée, 1.4DE « normal », dont la valeur est fixée arbitrairement à 100%. Par conséquent les activités luciférase de chaque construction sont exprimées comme étant un pourcentage relatif du contrôle.

### 5.2.6.1. Récapitulatif des résultats dans les cellules du tubule collecteur (V47)



**Figure 29.** Série de mutations à l'intérieur du DE



**Graphique 9.** Effet des 13 séries de mutations sur l'expression du gène rapporteur par rapport au contrôle 1.4DE dans les cellules V47. Les valeurs indiquées représentent la moyenne des 5 séries de mesures +/- SD. \* $p < 0,013$

Les cinq séries de mesures effectuées dans les cellules du tubule collecteur présentent des niveaux d'expression relativement stables : les valeurs des déviations standard variant de 4 à 27%. Ceci permet donc de tirer des conclusions relativement fiables quant aux rôles des différentes zones du DE. Parmi ces conclusions, nous pouvons voir qu'il se « dégage » deux zones intéressantes : la zone correspondant à l'extrémité 3' du DE

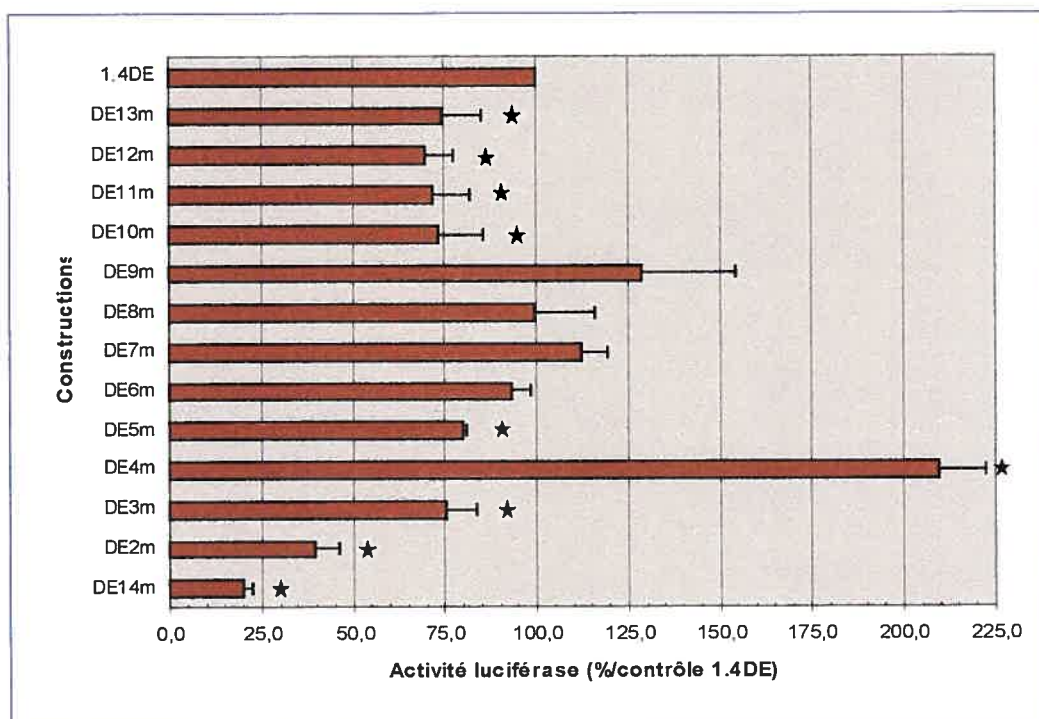
et la zone correspondant à l'extrémité 5' du DE. En effet, la séquence commune aux zones 2 et 14 montre une activité moyenne de 48% de l'activité du contrôle soit une diminution de 52% (valeurs de la zone 2, 53% et de la zone 14, 43% ce qui correspond donc à des diminutions respectives de 47 et 57%); la deuxième séquence, beaucoup plus étendue que la précédente, puisque couvrant les zones 10, 11 et 12 soit environ 30 pb, présente une activité moyenne de 55% de l'activité du contrôle soit une chute de 45% (valeur de la zone 10, 53%, de la zone 11, 56% et de la zone 12, 56% correspondant à des diminutions respectives de 47, 44 et 44%). Les autres zones quant à elles ne semblent avoir aucun rôle du fait qu'elles présentent un minimum de 70% de l'activité du contrôle. Il faut cependant noter que les mutations faites dans la zone 4 ont peut être créé un site activateur dans la mesure où cette zone présente une activité augmentée de plus de 50% par rapport au contrôle et ce malgré une valeur de déviation standard relativement élevée, 27%, quoique négligeable devant le niveau d'activité qui est de 151%.

Un second point très important se dégage de ce graphique récapitulatif : il semble en effet que la zone 13, chevauchant les zones 11 et 12, ne présente aucune diminution, ou alors relativement faible (21%), du niveau d'expression. Ceci est d'autant plus troublant que les deux zones qui la composent, les zones 11 et 12, entraînent quant à elles des chutes assez importantes, de 44% chacune. À la vue des différentes valeurs de déviation standard mesurées sur les 5 séries d'expériences, 7% pour la zone 11, 6,5% pour la zone 12 et 5,8% pour la zone 13, nous pouvons en conclure que ce constat n'est pas le résultat de mauvaises manipulations. Une explication possible, en se remémorant le schéma complexe du mode d'action des séquences régulatrices, est qu'une protéine se liant à la jonction des zones 10 et 11 pourrait interagir avec une seconde liée à l'extrémité 5' de la zone 12. Une seconde hypothèse pourrait être la création, lors du « dessin » des mutations, d'un site activateur permettant la liaison d'une protéine qui annihilerait les effets des mutations créées. L'analyse des séries de mutations dans les cellules du tubule proximal permettra d'expliquer, ou tout du moins de confirmer ou d'infirmer l'ensemble de ces hypothèses.

### 5.2.6.2. Récapitulatif des résultats dans les cellules du tubule proximal (V11)



**Figure 30.** Série de mutations à l'intérieur du DE

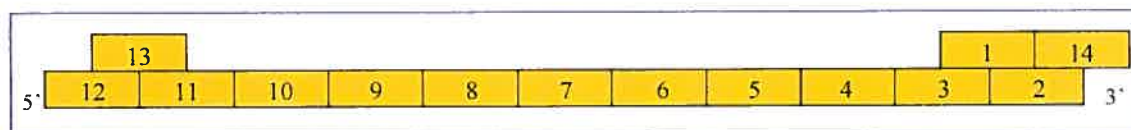


**Graphique 10.** Effet des 13 séries de mutations sur l'expression du gène rapporteur par rapport au contrôle 1.4DE dans les cellules V11. Les valeurs indiquées représentent la moyenne des 5 séries de mesures +/- SD. \* $p < 0,013$

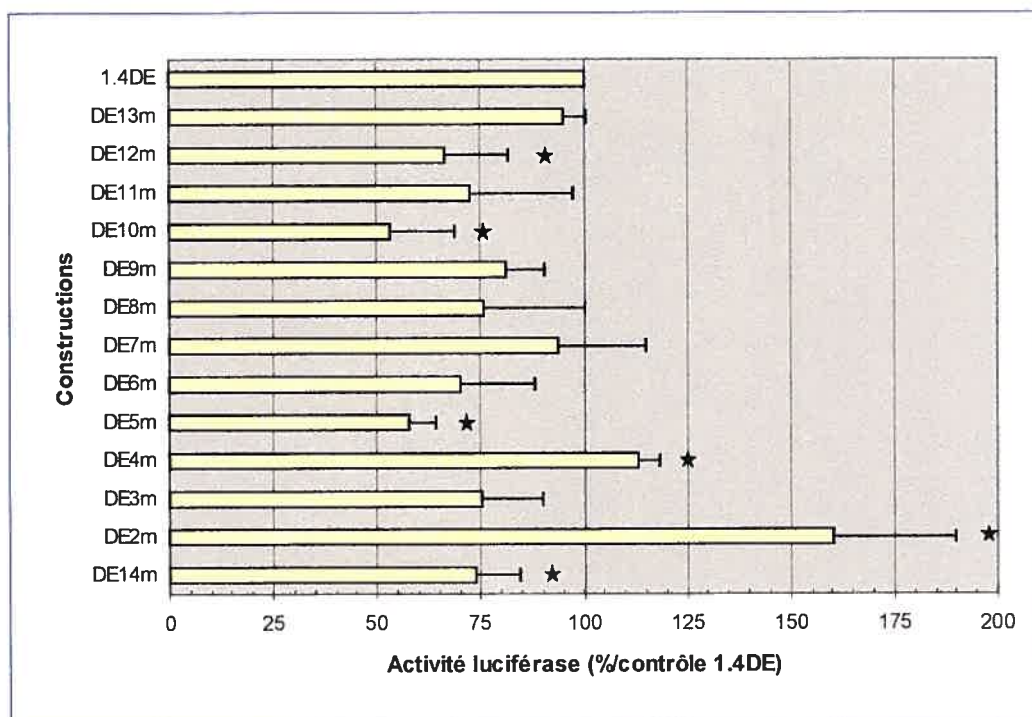
Les observations énoncées précédemment dans le cas des cellules du tubule collecteur se retrouvent ici avec cependant quelques nuances. En effet, les données obtenues semblent relativement fiables dans la mesure où les déviations standard obtenues sur les cinq séries de mesures varient de 2,2 à 26%. De plus, d'après ces résultats, la même zone apparaissant comme activatrice dans les cellules du tubule collecteur, la zone 4, induit

un niveau d'expression également très élevé dans les cellules du tubule proximal : forte augmentation de plus de 110%. De la même manière, les autres zones correspondant à l'intérieur du DE ne présentent quasiment aucune variation par rapport au contrôle. Toutefois, nous pouvons noter deux différences importantes entre cette lignée et la précédente : la séquence commune aux zones 2 et 14 présente des diminutions d'activité beaucoup plus prononcées que dans le cas des cellules du tubule collecteur : l'activité moyenne de cette zone est de 29% soit une diminution de plus de 70% par rapport au contrôle (valeurs de la zone 2, 39% et de la zone 14, 20% correspondant à des diminutions respectives de 61 et 80%); les zones 10, 11 et 12 ne montrent pas de variation d'activité par rapport au contrôle : l'activité minimum correspond à 70% de l'activité du contrôle, ce qui correspond à une diminution de 30% par rapport à ce contrôle. Cette diminution est beaucoup plus faible que dans les cellules du tubule collecteur où la diminution atteint quasiment 50%. Cette constatation permet de confirmer l'hypothèse suivant laquelle ces 3 zones, 10, 11 et 12, seraient impliquées dans l'activation spécifique de l'*AVPR2* dans les cellules du tubule collecteur. Ceci semble d'autant plus vrai que dans les deux lignées cellulaires, les mutations de la zone 13 n'entraînent aucune chute de l'expression ce qui élimine l'hypothèse de la création d'un site activateur lors du « dessin » des mutations de cette zone.

### 5.2.6.3. Récapitulatif des résultats dans les fibroblastes (10T1/2)



**Figure 31.** Série de mutations à l'intérieur du DE



**Graphique 11.** Effet des 13 séries de mutations sur l'expression du gène rapporteur par rapport au contrôle 1.4DE dans les cellules 10T1/2. Les valeurs indiquées représentent la moyenne des 5 séries de mesures  $\pm$  SD. \* $p < 0,013$

À première vue, les résultats observés dans les deux lignées rénales ne sont pas retrouvés dans les fibroblastes. En effet, les séquences situées à l'extrémité 3' du point de cassure, zones 2 et 14, présentent des niveaux d'expression soit plus élevés, soit légèrement diminués par rapport au contrôle (74% et 160% respectivement pour la zone 14

et la zone 2). Il en va de même pour les autres zones qui ont, pour la majorité d'entre elles des niveaux d'activité semblables au contrôle. Cependant, nous pouvons noter que l'extrémité 5' du point de cassure, correspondant aux zones 10, 11, 12 et 13, révèle des niveaux d'activités semblables au contrôle avec une exception toutefois pour la zone 10. En effet, les zones 11, 12 et 13 présentent respectivement des niveaux d'activité de 60, 70 et 95% par rapport au contrôle alors que la zone 10 démontre une chute de l'activité. Cependant, il faut remarquer que les valeurs des déviations standard obtenues dans les fibroblastes sont dans l'ensemble largement supérieures à celles obtenues dans les lignées rénales. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette lignée cellulaire présente une vitesse de croissance beaucoup plus élevée que les autres et que l'étape de comptage des cellules précédant la transfection peut être sujette à des erreurs. Ces deux éléments peuvent conduire à des quantités de cellules devant être transfectées, et donc à des résultats de mesures d'activité, très variables.

## Conclusions et perspectives

Au terme de ces travaux préliminaires visant à étudier la régulation transcriptionnelle du gène codant le récepteur de type 2 à la vasopressine, dont le rôle dans l'apparition du diabète lié à l'X a été maintes fois démontré, il se dégage deux points essentiels. Tout d'abord, la zone délétée de 102 pb, retrouvée dans une famille porteuse de DIN, située en amont de l'*AVPR2* semble jouer un rôle très important dans l'expression de celui-ci. Ensuite, l'étude minutieuse de cette région a révélé la présence d'au minimum deux régions importantes, dont l'une nécessite des investigations plus poussées, dans ces 102 pb.

Comme mentionné dans la section résultats, lorsque la zone délétée de 102 pb est clonée en amont du promoteur de l'*AVPR2* et du gène rapporteur, celle-ci induit une augmentation très importante du niveau d'expression du gène. Cet effet activateur est retrouvé dans les deux lignées de cellules rénales, mais pas dans les fibroblastes ce qui traduit un effet «tissu-spécifique». Cependant, le rôle de cet élément dans les deux lignées rénales est en totale contradiction avec la « réalité » physiologique puisque le récepteur à la vasopressine de type 2 est exprimé exclusivement dans les cellules du tubule collecteur. En effet, dans ce segment particulier du rein, ce récepteur conduit, suite à la liaison de l'hormone antidiurétique, à une expression de molécules d'aquaporines qui elles-mêmes permettront la réabsorption d'eau au niveau des cellules principales de ce tissu. Par conséquent, ces premières séries d'expériences ont permis de démontrer qu'effectivement cette zone délétée, retrouvée chez des patients atteints de diabète insipide néphrogénique lié à l'X, était impliquée dans l'expression de ce récepteur ; toutefois, elles n'ont pas permis de mettre en évidence un rôle exclusif de cet élément dans les cellules du tubule collecteur.

Par la suite, l'étude détaillée du DE par la création de séries de mutations de 10 pb par 10 pb de la séquence complète a mis en évidence trois régions. La première, correspondant à l'extrémité 3' du DE, paraît être directement responsable de l'expression



du gène rapporteur dans les lignées de cellules rénales dans la mesure où la modification de sa séquence entraîne une chute du niveau de l'expression qui est plus importante dans les cellules du tubule proximal que dans les cellules du tubule collecteur. La deuxième zone identifiée, beaucoup plus grande que la précédente et située à l'extrémité 5' du DE, semble quant à elle spécifique des cellules du tubule collecteur. En effet, le fait de muter les séquences la composant n'entraîne quasiment aucune variation des niveaux d'expression du gène rapporteur dans les cellules du tubule proximal alors qu'une diminution relativement importante est observée dans l'autre lignée. Cependant, les résultats obtenus dans les cellules du tubule collecteur semblent laisser croire qu'une troisième zone, cette fois-ci localisée en amont du point de cassure en 5' du DE, interagirait avec la deuxième zone et pourrait être potentiellement responsable de l'expression «cellule-spécifique» de l'*AVPR2*. Cette conclusion est rendue valide par le fait qu'une zone utilisée dans les expériences, la zone 13 sur les schémas, donne des niveaux d'expression similaires aux contrôles alors qu'elle correspond à une zone chevauchant deux zones engendrant chacune une chute du niveau d'expression. Dans le même temps, des résultats différents sont observés dans l'autre lignée rénale : aucune des zones précédemment citées n'entraîne de diminution du niveau d'expression ce qui semble confirmer l'hypothèse émise suivant laquelle la région 5' du DE « porterait » la responsabilité de l'effet «cellule-spécifique» de l'expression de l'*AVPR2*. Cependant, cette responsabilité ne serait pas seulement due à cette zone mais plutôt à un phénomène de coopération entre celle-ci et d'autres séquences.

L'ensemble de ces résultats préliminaires, bien qu'encourageant, ne permet pas à lui seul d'expliquer l'énorme complexité que représente la régulation transcriptionnelle d'un gène eucaryote tel que l'*AVPR2*. Cependant il représente une partie de ce processus et permettra par la suite d'étendre les investigations.

Parmi celles-ci, nous pouvons distinguer deux grandes voies : la première consistant à pousser plus avant l'étude de ces séquences avec entre autres la caractérisation des différentes protéines se liant aux zones identifiées. Pour ce faire, des études informatiques

exhaustives seront réalisées afin de rechercher si d'éventuelles protéines répertoriées peuvent lier une ou plusieurs de nos séquences et, le cas échéant, si celles-ci sont connues comme étant douées d'activité «cellule-spécifique». Il faut mentionner qu'une première recherche informatique s'est révélée totalement infructueuse dans la mesure où aucune étude ne rapporte l'existence de protéine(s) connue(s) à ce jour comme étant impliquée(s) dans l'expression de l'*AVPR2*, exception faite de l'étude menée par le Dr. Rossert et son équipe (65). Dans le même temps, des expériences par chromatographie d'affinité sur colonne devraient permettre, d'une part l'identification des protéines se liant spécifiquement à nos séquences, et d'autre part, l'existence d'éventuels « ponts » protéiques permettant le rapprochement des séquences régulatrices et du promoteur de l'*AVPR2*. Dans le cadre de notre coopération avec le Dr. Rossert, nous allons également tester l'effet d'une protéine mise en évidence par son équipe et exprimée de manière très importante dans les cellules du tubule collecteur (papier soumis). En effet, cette équipe a caractérisé une protéine de la classe des « forkhead », mais fort peu documentée, et poursuit ses investigations afin de comprendre son rôle ainsi que son niveau d'implication au niveau des cellules du tubule collecteur. Afin d'établir si cette protéine pourrait, ou non, lier l'une de nos zones et entraîner un effet activateur, nous allons de nouveau tester les constructions qui ont permis de mettre en avant le rôle du DE dans les cellules du tissu rénal avec et sans le vecteur d'expression de cette protéine. Parallèlement à ceci, nous allons également tester les effets de cette protéine sur différentes constructions spécifiques aux zones mises en évidence par l'étude détaillée du DE. Par la suite un second volet de notre étude apparaît comme étant indispensable afin de mettre en évidence d'éventuels phénomènes de coopération.

Comme de nombreux travaux le mettent en évidence, l'activation de la transcription d'un gène ne fait pas intervenir uniquement le promoteur et une seule séquence régulatrice, mais est plutôt le résultat d'une étroite relation entre un promoteur et de nombreuses zones régulatrices. En effet, les interactions de différentes zones entre elles et le promoteur débouchent sur une expression «tissu-spécifique» : des protéines retrouvées dans différents

tissus pourront, en fonction de leur ordre « d'entrée » dans l'échafaudage protéique, avoir des effets totalement différents et conduire, ou non, à l'expression d'un gène donné. Par conséquent il est évident que l'*AVPR2* n'échappe pas à cette règle et que sa régulation ne peut pas s'expliquer par le seul rôle de notre DE. Dans la mesure où la position du DE est localisée à très grande distance de l'*AVPR2*, il est essentiel de pratiquer des expériences de digestion à la DNase I (DNase Hypersensitivity Site). En effet, ces expériences permettent d'étudier la structure chromatinienne de grandes zones d'ADN génomique afin de déterminer si des zones facilement accessibles aux protéines régulatrices sont retrouvées dans ces fragments. De nombreuses études ont permis de montrer que ce type d'expériences de digestion à la DNase I révélaient la présence de LCR dont le rôle est hautement lié à une expression précise en fonction du tissu et du stade de développement du gène se trouvant sous sa dépendance (107, 108, 109, 110). Il faut noter qu'une étude comparée des séquences génomiques de différents mammifères, par exemple l'homme, la souris, le singe etc., permet d'avoir une idée préalable des zones pouvant jouer un rôle dans l'activation de la transcription. En effet, lorsque des séquences sont retrouvées conservées entre les espèces et au cours de l'évolution cela signifie qu'elles remplissent un rôle important. Il faut préciser que la séquence de notre DE a fait l'objet d'une telle étude et que, la première zone identifiée à l'extrémité 3' est particulièrement bien conservée chez la souris. Par contre l'extrémité 5', qui pourrait être potentiellement responsable de l'effet « cellule-spécifique » de l'expression de l'*AVPR2* présente une homologie de séquence beaucoup moins grande, voir quasi nulle par endroit. Cette comparaison de séquence a été également initiée pour la zone de 8 kb. Ces expériences à la DNase permettront également d'avoir une idée plus précise quant aux différentes constructions à réaliser en vue de l'étude de la deuxième zone délétée de 8 kb identifiée dans une famille atteinte de DIN lié à l'X. Nous pourrons ainsi « découper » notre zone 8 kb en fonction des zones découvertes suite à cette digestion.

À terme, l'ensemble de ces expériences doit permettre de mieux comprendre le mécanisme d'expression de l'*AVPR2* et d'établir la présence d'un éventuel « locus control

element » qui, de par ses « propriétés » (localisé très loin du gène qu'il régule ; une, ou des délétions l'affectant entraînant un DIN, etc.), ressemble à celui existant au niveau du gène codant la  $\beta$ -globine. Cependant, les homologues potentielles énoncées entre le fonctionnement du gène *AVPR2* et des gènes possédant un LCR (gène de la  $\beta$ -globine, par exemple), ne l'ont été que dans un but purement expérimental. En effet, le gène de la globine ne présente aucune homologie de structure avec l'*AVPR2* : 5 gènes arrangés de manière linéaire dont l'expression est alternative en fonction du stade de développement, à savoir lorsque l'un est activé, par exemple le gène  $\epsilon$ -globine durant le stade embryonnaire, les autres gènes sont réprimés (77, 111). Il en va de même pour l'organisation structurale des gènes codant les pigments visuels : les deux gènes humains, codant pour les pigments rouge et vert, sont disposés en tandem d'une manière « tête-bêche », à savoir l'extrémité 5' de l'un des tandems étant mitoyenne directe avec l'extrémité 3' de l'autre (112). De plus, le parallèle entre les deux types de gènes, *AVPR2* et gènes possédant un LCR, s'est appuyé sur l'observation que des patients atteints de tous les signes cliniques du DIN mais présentant des gènes de l'*AVPR2* et de l'*AQP2* totalement normaux étaient porteurs de délétions à très grande distance du gène. Ce qui nous a conduit à imaginer l'existence d'une zone potentiellement importante pour la régulation de la transcription de ce gène à ce niveau. Ceci étant en accord avec les remarques énoncées dans le cas du gène de la  $\beta$ -globine où des délétions répertoriées en amont du gène conduisent à des thalassémies ou, dans le cas des gènes de pigmentation de la vision, des pertes de fonction des pigments rouges et verts sont imputables à des délétions localisées en 5' (77, 112). D'autres gènes disposant de LCR sembleraient plus « proches » de l'*AVPR2*, par exemple le gène de la tyrosine kinase, le gène de la desmine musculaire, etc. Cependant, après une étude plus approfondie, il ressort qu'aucun ne présente réellement de similitudes. En effet, le gène de la tyrosine kinase est bien exprimé, et par voie de conséquence, régulé durant le développement, mais, contrairement à l'*AVPR2* il est exprimé dans différentes cellules : mélanocytes de la crête neurale, cellules de la peau, cellules de l'iris, follicule pileux, cellules épithéliales de la rétine, etc.; quant au gène de la desmine, il est exprimé dans à peu

près tous les types de muscles : cardiaque, squelettiques, lisses et ce quelque soit le stade du développement (113, 114).

Cependant, il semblerait que l'*AVPR2* est exprimé au niveau des cellules endothéliales et que cette expression pourrait être responsable de la stimulation des facteurs de coagulation et des effets hémodynamiques observés après infusion de l'agoniste dDAVP. En effet une étude du Dr. Bichet a démontré que l'utilisation de cet agoniste de l'AVP chez des patients atteints de DIN lié à l'*X* mais sans défaut du gène de l'*AQP2*, entraînait une augmentation de sécrétion des facteurs de coagulation VIIIc et de von Willebrand (115). Une seconde étude a également démontré que des récepteurs AVPR2 ne se localisaient pas exclusivement au niveau des cellules rénales, mais également au niveau des cellules pulmonaires (116). Par conséquent, la seule explication possible à ce double rôle et à cette double localisation de ce type de récepteur ne peut être qu'une expression différentielle en fonction du tissu. Ceci nous laisse supposer qu'il y aurait au minimum deux zones distinctes responsables de cette expression tissulaire. En conséquence, il conviendra donc dans la suite de l'étude, de s'attacher à voir si notre DE joue un rôle dans la synthèse des facteurs de coagulation, et tester son rôle éventuel sur des cellules pulmonaires. De plus, en se référant aux nombreuses études menées sur le LCR du gène de la  $\beta$ -globine, il serait particulièrement intéressant d'étudier non seulement la structure chromatinienne, par des expériences de digestion à la DNase, mais également d'étudier les mécanismes de remodelage de celle-ci (107). Comme par exemple d'étudier les modifications post-traductionnelles des histones par phosphorylation, méthylation et acétylation qui conduisent à des modifications de structure des nucléosomes et facilitent donc la fixation de protéines activatrices et/ou qui recrutent elles-mêmes des protéines activatrices, mais cela est une autre histoire.....

L'étude de la régulation transcriptionnelle de l'*AVPR2* pourra, à terme, déboucher sur un traitement des patients atteints de DIN par thérapie génique. Cependant il faut noter que cette stratégie ne se destinera pas uniquement au traitement des patients présentant des délétions au niveau des zones régulatrices, mais à l'ensemble des patients souffrant de cette

pathologie. En effet, de par son principe, la thérapie génique vise à introduire dans une cellule via un vecteur (virus, liposomes, etc.) un gène codant une protéine déficiente dans les cellules initiales de l'organisme. Il est donc évident que les patients atteints de DIN causé par une non-expression de l'*AVPR2* sont sujets à recevoir un vecteur comportant le gène de l'*AVPR2* normal afin que celui-ci soit exprimé de manière suffisante pour répondre à une stimulation par l'AVP et ce quelque soit la cause de cette non-expression (mutations dans le gène de l'*AVPR2*, délétion à grande distance en 5' ou 3' de ce gène, délétion du gène en lui-même, etc.).

Les rares exemples d'approches thérapeutiques visant à traiter des pathologies héréditaires concernent soit des gènes dont l'expression est faiblement régulée, par exemple le gène de l'adénosine désaminase (ADA); soit des gènes dont le transfert et/ou la culture des cellules réceptrices sont aisés, par exemple le gène du récepteur au lipide de faible densité (LDLR ou low density lipid receptor) dans le cas des hypercholestérolémies familiales, ou le gène du récepteur transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR ou cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Dans ces deux cas, les applications thérapeutiques potentielles par thérapie génique sont retardées dans la mesure où les méthodes de transfert et les efficacités qui leur sont liées sont aussi limitées (117, 118). Une troisième pathologie héréditaire a fait l'objet d'études visant à déboucher sur un traitement par thérapie génique : la dystrophie musculaire de Duchenne. Dans le cas du gène de la dystrophine, dont la non expression entraîne une dégénérescence des fibres musculaires, le transfert pur et simple du gène codant la protéine s'est révélé d'une rare complexité : absence de système fiable de transfert, taille trop importante du gène (119, 120).

Cependant, une autre approche a été suggérée : pourquoi ne pas compenser l'absence d'activité d'un gène par la stimulation d'un autre gène dont l'expression a lieu à un autre moment du développement de manière normale ? Certaines études se sont en effet attachées à « réactiver » le gène de l'utrophine, homologue de la dystrophine synthétisée durant le stade fœtal, qui pourrait remplacer l'action de la dystrophine déficiente (120-122). Une idée similaire a été émise pour traiter les patients atteints de  $\beta$ -thalassémies : l'idée est

de contrecarrer le défaut de production de  $\beta$ -globine en réactivant d'autres gènes globines, comme par exemple le gène de la  $\gamma$ -globine exprimée durant le stade embryonnaire.

Il faut toutefois noter que, dans un cas comme dans l'autre, la réactivation thérapeutique repose plus sur une approche pharmacologique, via des agents tels que l'hydroxyurée ou le butyrate, par exemple, que sur une thérapie génique au sens strict (111, 123). De plus une autre approche visant à rétablir un niveau d'expression normal est employée dans le cas des thalassémies dues à des mutations à l'intérieur du gène : l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens  $\alpha$ , en effet, permis de rétablir des niveaux d'expression de  $\beta$ -globine chez des patients atteints de mutations au niveau des sites d'épissage (124).

Malgré les nombreuses études ainsi que les nombreux espoirs placés dans la thérapie génique pour traiter des pathologies héréditaires, il est de plus en plus évident que manipuler de la sorte le patrimoine génétique n'est pas sans risque pour la viabilité même des individus. En effet, une des rares expériences, qui est d'ailleurs la première « réussie », de traitement par thérapie génique, de nourrissons atteints de la maladie d'immunodéficience combinée sévère liée à l'X, les « enfants-bulle » car sans système immunitaire, se révèle problématique : sur 11 enfants traités, 9 ont été guéris, pour combien de temps?, et 2 ont développé des leucémies. Ce qui a entraîné la suspension immédiate de toute tentative de traitement par thérapie génique (125-128). Il semble donc évident que les maladies héréditaires ne pourront être traitées avec succès par thérapie génique avant de très nombreuses années.....

## Bibliographie

1. **Bichet DG, Zellweger M.** Diabète insipides néphrogéniques. *EMC-Néphrologie*. 2004;in press.
2. **Guyton A, Hall J.** The kidney and body fluids. Unit 5. *Textbook of medical physiology*. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders company; 2000:280-379.
3. **Esther CR, Marino EM, Howard TE, et al.** The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest*. 1997;99(10):2375-85.
4. **Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, et al.** Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(7):2735-9.
5. **Krege JH, Kim HS, Moyer JS, et al.** Angiotensin-converting enzyme gene mutations, blood pressures, and cardiovascular homeostasis. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):150-7.
6. **Oliverio MI, Kim HS, Ito M, et al.** Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15496-501.
7. **Fern RJ, Yesko CM, Thornhill BA, Kim HS, Smithies O, Chevalier RL.** Reduced angiotensinogen expression attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *J Clin Invest*. 1999;103(1):39-46.
8. **Zhang SL, To C, Chen X, et al.** Effect of renin-angiotensin system blockade on the expression of the angiotensinogen gene and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells. *Exp Nephrol*. 2001;9(2):109-17.
9. **Zhang SL, To C, Chen X, et al.** Essential role(s) of the intrarenal renin-angiotensin system in transforming growth factor-beta1 gene expression and induction of hypertrophy of rat kidney proximal tubular cells in high glucose. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(2):302-12.



10. **Verkman AS, Mitra AK.** Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278(1):F13-F28.
11. **Morello J-P, Bichet DG.** Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:607-630.
12. **Yang B, Bankir L, Gillespie A, Epstein CJ, Verkman AS.** Urea-selective concentrating defect in transgenic mice lacking urea transporter UT-B. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10633-7.
13. **Valtin H, Schafer JA.** Concentration and dilution of urine: H<sub>2</sub>O balance. In: Valtin H, Schafer JA, eds. *Renal Function*. 3rd ed. Boston: Little, Brown; 1995:151-182.
14. **Richter D.** Molecular events in the expression of vasopressin and oxytocin and their cognate receptors. *Am J Physiol.* 1988;255:F207-F219.
15. **Rao VV, Loffler C, Battey J, Hansmann I.** The human gene for oxytocin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization. *Cell Genet.* 1992;61:271-273.
16. **Willcutts MD, Felner E, White PC.** Autosomal recessive familial neurohypophyseal diabetes insipidus with continued secretion of mutant weakly active vasopressin. *Hum Mol Genet.* 1999;8(7):1303-7.
17. **Berl T, Robertson GL.** Pathophysiology of water metabolism. In: Brenner BM, ed. *Brenner and Rector's The Kidney*. 6th ed. Vol. 1. Philadelphia: W. B Saunders Company; 2000:866-924.
18. **Wilson Y, Nag N, Davern P, et al.** Visualization of functionally activated circuitry in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(5):3252-7.
19. **Yanovski JA, Friedman TC, Nieman LK, et al.** Inferior petrosal sinus AVP in patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;47(2):199-206.
20. **Robertson GL, Berl T.** Pathophysiology of water metabolism. In: Brenner BM, Rector FC, eds. *The Kidney*. 5th ed. Philadelphia: W. B Saunders Company; 1996:873-928.
21. **Thrasher TN, Brown CJ, Keil LC, Ramsay DJ.** Thirst and vasopressin release in the dog: an osmoreceptor or sodium receptor mechanism? *Am J Physiol.* 1980;238(5):R333-9.

22. **Jard S, Elands J, Schmidt A, Barberis C.** Vasopressin and oxytocin receptors : an overview. In: Imura H, Shizume K, eds. *Progress in Endocrinology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.; 1988:1183-1188.
23. **Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M.** The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:175-202.
24. **Morello J-P, Salahpour A, Laperrière A, et al.** Association of calnexin with the wild type and mutant AVPR2 that cause nephrogenic diabetes insipidus. *Biochem J*. 2001;40(23):6766-6775.
25. **Schrier RW, Cadnapaphornchai MA.** Renal aquaporin water channels: from molecules to human disease. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003;81(2):117-31.
26. **Arthus M-F, Lonergan M, Crumley MJ, et al.** Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:1044-1054.
27. **Bichet DG.** Nephrogenic and central diabetes insipidus. In: Schrier RW, ed. *Diseases of the Kidney and Urinary Tract*. 7th ed. Vol. III. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:2549-2576.
28. **Bichet DG.** Nephrogenic diabetes insipidus. In: Cameron JS, Davison AM, Grünfeld JP, Kerr DNS, Ritz E, eds. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. New York: Oxford University Press; 1992:789-800.
29. **Crawford JD, Bode HH.** Disorders of the posterior pituitary in children. In: Gardner LI, ed. *Endocrine and Genetic Diseases of Childhood and Adolescence*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1975:126-158.
30. **Bichet DG.** Nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Med*. 1998;105:431-442.
31. **Morello JP, Salahpour A, Laperrière A, et al.** Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest*. 2000;105:887-895.
32. **Deen PMT, Croes H, van Aubel RAMH, Ginsel LA, van Os CH.** Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *J Clin Invest*. 1995;95:2291-2296.

33. **Borgnia M, Nielsen S, Engel A, Agre P.** Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:425-58.
34. **Heymann JB, Engel A.** Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels. *News Physiol Sci.* 1999;14:187-193.
35. **Agre P, Preston GM, Smith BL, et al.** Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol.* 1993;34:F463-F476.
36. **Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA.** Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.* 2002;82(1):205-44.
37. **van Os CH, Deen PM.** Role of aquaporins in renal water handling: physiology and pathophysiology. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(7):1645-51.
38. **Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP.** Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet.* 1996;13(2):183-8.
39. **Karolyil L, Konrad M, Kockerling A, et al.** Mutations in the gene encoding the inwardly-rectifying renal potassium channel, ROMK, cause the antenatal variant of Bartter syndrome: evidence for genetic heterogeneity. International Collaborative Study Group for Bartter-like Syndromes [published erratum appears in Hum Mol Genet 1997 Apr;6(4):650]. *Hum Mol Genet.* 1997;6(1):17-26.
40. **Estevez R, Boettger T, Stein V, et al.** Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature.* 2001;414(6863):558-561.
41. **Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, et al.** Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet.* 2001;29(3):310-4.
42. **Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, et al.** Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet.* 1997;17(2):171-8.
43. **Boton R, Gaviria M, Batlle DC.** Prevalence, pathogenesis, and treatment of renal dysfunction associated with chronic lithium therapy. *Am J Kidney Dis.* 1987;10(5):329-45.

44. **Marples D, Christensen S, Christensen EI, Ottosen PD, Nielsen S.** Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest.* 1995;95:1838-1845.
45. **Marples D, Frokiaer J, Dorup J, Knepper MA, Nielsen S.** Hypokalemia-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla and cortex. *J Clin Invest.* 1996;97(8):1960-1968.
46. **Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS.** Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4. *J Clin Invest.* 1997;100(5):957-62.
47. **Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS.** Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J Biol Chem.* 1998;273(8):4296-9.
48. **Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, et al.** Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat Genet.* 1999;21(1):95-8.
49. **Ma T, Song Y, Yang B, et al.** Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(8):4386-91.
50. **Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS.** Neonatal mortality in an aquaporin-2 knock-in mouse model of recessive nephrogenic diabetes insipidus. *J Biol Chem.* 2001;276(4):2775-2779.
51. **Birnbaumer M, Seibold A, Gilbert S, et al.** Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature.* 1992;357:333-335.
52. **de Keyser Y, Auzan C, Lenne F, et al.** Cloning and characterization of the human V3 pituitary vasopressin receptor. *FEBS Letters.* 1994;356:215-220.
53. **Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H.** Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature.* 1992;356:526-529.
54. **Filipek S, Stenkamp RE, Teller DC, Palczewski K.** G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RHODOPSIN: A Prospectus. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:851-79.
55. **Pierce K, Premont R, Lefkowitz.** Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews.* 2002;3:639-650.

56. **Grazzini E, Lodboerer AM, Perez-Martin A, Joubert D, Guillon G.** Molecular and functional characterization of V1b vasopressin receptor in rat adrenal medulla. *Endocrinol.* 1996;137:3906-3914.
57. **Abel A, Wittau N, Wieland T, Schultz G, Kalkbrenner F.** Cell cycle-dependent coupling of the vasopressin V1a receptor to different G proteins. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32543-51.
58. **Wong LL, Verbalis JG.** Vasopressin V2 receptor antagonists. *Cardiovasc Res.* 2001;51(3):391-402.
59. **Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW.** Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(24):11663-7.
60. **Marples D, Frokiaer J, Nielsen S.** Long-term regulation of aquaporins in the kidney. *Am J Physiol.* 1999;276(3 Pt 2):F331-9.
61. **Rosenthal W, Antaramian A, Gilbert S, Birnbaumer M.** Nephrogenic diabetes insipidus. A V2 vasopressin receptor unable to stimulate adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 1993;268(18):13030-3.
62. **Bichet DG, Birnbaumer M, Lonergan M, et al.** Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Hum Genet.* 1994;55:278-286.
63. **Mitchell PJ, Tjian R.** Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* 1989;245(4916):371-8.
64. **White RJ, Jackson SP.** The TATA-binding protein: a central role in transcription by RNA polymerases I, II and III. *Trends Genet.* 1992;8(8):284-8.
65. **Calmont A, Reichwald K, Ronco P, Rossert J.** Identification of a short cis-acting element in the human vasopressin type 2 receptor gene which confers high-level expression of a reporter gene specifically in collecting duct cells. *Mol Endocrinol.* 2000;14(10):1682-1695.
66. **Roeder RG, Rutter WJ.** Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1970;65(3):675-82.

67. **Weinmann R, Roeder RG.** Role of DNA-dependent RNA polymerase 3 in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(5):1790-4.
68. **Abmayr SM, Workman JL.** Transcription factors prominently in Lasker Award to Roeder. *Cell.* 2003;115(3):243-6.
69. **Butler JE, Kadonaga JT.** The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 2002;16(20):2583-92.
70. **Muller CW.** Transcription factors: global and detailed views. *Curr Opin Struct Biol.* 2001;11(1):26-32.
71. **Kadonaga JT.** The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med.* 2002;34(4):259-64.
72. **Roeder RG.** Nuclear RNA polymerases: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription. *Methods Enzymol.* 1996;273:165-71.
73. **Pelham HR.** A regulatory upstream promoter element in the Drosophila hsp 70 heat-shock gene. *Cell.* 1982;30(2):517-28.
74. **Fiering S, Whitelaw E, Martin DI.** To be or not to be active: the stochastic nature of enhancer action. *Bioessays.* 2000;22(4):381-7.
75. **Blackwood EM, Kadonaga JT.** Going the distance: a current view of enhancer action. *Science.* 1998;281(5373):61-3.
76. **Terraz C, Toman D, Delauche M, Ronco P, Rossert J.** Teta-EF1 binds to a far upstream sequence of the mouse Pro-alpha1(I) collagen gene and represses its expression in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37011-37019.
77. **Levings PP, Bungert J.** The human beta-globin locus region. A center of attraction. *Eur J Biochem.* 2002;269:1589-1599.
78. **Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G.** Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell.* 1987;51(6):975-985.
79. **Glass CK, Rosenfeld MG.** The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000;14(2):121-41.

80. **Goodman RH, Smolik S.** CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 2000;14(13):1553-77.
81. **Lemon B, Tjian R.** Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 2000;14(20):2551-69.
82. **McKenna NJ, O'Malley BW.** Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 2002;108(4):465-74.
83. **Daube SS, von Hippel PH.** Functional transcription elongation complexes from synthetic RNA-DNA bubble duplexes. *Science.* 1992;258(5086):1320-4.
84. **Tora L.** A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 2002;16(6):673-5.
85. **Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D, Ebright RH.** New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 1998;12(1):34-44.
86. **Burke TW, Kadonaga JT.** Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 1996;10(6):711-24.
87. **Oelgeschlager T, Chiang CM, Roeder RG.** Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature.* 1996;382(6593):735-8.
88. **Burke TW, Kadonaga JT.** The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes Dev.* 1997;11(22):3020-31.
89. **Hirose Y, Manley JL.** RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* 2000;14(12):1415-29.
90. **Rosenthal N.** Regulation of gene expression. *N Engl J Med.* 1994;331(14):931-3.
91. **Roeder RG.** The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci.* 1991;16(11):402-8.
92. **Green MR.** Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Annu Rev Cell Biol.* 1991;7:559-99.

93. **Reed R.** Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(3):340-5.
94. **Shatkin AJ, Manley JL.** The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol.* 2000;7(10):838-42.
95. **von Hippel PH, Yager TD.** The elongation-termination decision in transcription. *Science.* 1992;255(5046):809-12.
96. **Wahle E, Kuhn U.** The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1997;57:41-71.
97. **Ptashne M, Gann A.** Transcriptional activation by recruitment. *Nature.* 1997;386(6625):569-77.
98. **Horikoshi M, Hai T, Lin YS, Green MR, Roeder RG.** Transcription factor ATF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex. *Cell.* 1988;54(7):1033-42.
99. **Terraz C, Brideau G, Ronco P, Rossert J.** A combination of *cis*-acting elements is required to activate the Pro- $\alpha 1(I)$  collagen promoter in tendon fibroblasts of transgenic mice. *J Biol Chem.* 2002;277(21):19019-19026.
100. **Vandewalle A, Lelongt B, Geniteau-Legendre M, et al.** Maintenance of proximal and distal cell functions in SV40-transformed tubular cell lines derived from rabbit kidney cortex. *J Cell Physiol.* 1989;141(1):203-21.
101. **Prié D, Ronco PM, Baudouin B, et al.** Activation of the simian virus 40 (SV40) genome abrogates sensitivity to AVP in a rabbit collecting tubule cell line by repressing membrane expression of AVP receptors. *J Cell Biol.* 1991;113:951-962.
102. **Debiec H, Christensen EI, Ronco PM.** The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *J Cell Biol.* 1998;143:2067-2079.
103. **Prié D, Dussaule JC, Lelongt B, et al.** Principal cell-specific antigen and hormonal regulatory network in RC.SVtsA58 cell line. *Am J Physiol.* 1994;266:C1628-1638.



104. **Rossert J, Eberspaecher H, de Crombrughe B.** Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J Cell Biol.* 1995;129(5):1421-32.
105. **Goldberg H, Helaakoski T, Garrett LA, et al.** Tissue-specific expression of the mouse alpha 2(I) collagen promoter. Studies in transgenic mice and in tissue culture cells. *J Biol Chem.* 1992;267(27):19622-30.
106. **Bailar III JC, Mosteller F,** eds. *Medical Uses of Statistics.* Waltham: New England Journal of Medicine Books; 1986.
107. **Harju S, McQueen KJ, Peterson KR.** Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002;227(9):683-700.
108. **Gui CY, Dean A.** Acetylation of a specific promoter nucleosome accompanies activation of the epsilon-globin gene by beta-globin locus control region HS2. *Mol Cell Biol.* 2001;21(4):1155-63.
109. **Navas PA, Peterson KR, Li Q, McArthur M, Stamatoyannopoulos G.** The 5'HS4 core element of the human beta-globin locus control region is required for high-level globin gene expression in definitive but not in primitive erythropoiesis. *J Mol Biol.* 2001;312(1):17-26.
110. **McArthur M, Gerum S, Stamatoyannopoulos G.** Quantification of DNaseI-sensitivity by real-time PCR: quantitative analysis of DNaseI-hypersensitivity of the mouse beta-globin LCR. *J Mol Biol.* 2001;313(1):27-34.
111. **Olivieri NF, Weatherall DJ.** The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin. *Hum Mol Genet.* 1998;7(10):1655-8.
112. **Wang Y, Macke JP, Merbs SL, et al.** A locus control region adjacent to the human red and green visual pigment genes. *Neuron.* 1992;9:429-440.
113. **Montoliu L, Umland T, Schütz G.** A locus control region at -12 kb of the tyrosinase gene. *EMBO J.* 1996;15(22):6026-6034.
114. **Raguz S, Hobbs C., Yague E, Ioannou PA, Walsh FS, Antoniou M.** Muscle-specific locus control region activity associated with the human desmin gene. *Developmental Biol.* 1998;201:26-42.

115. **Bichet DG, Razi M, Lonergan M, et al.** Hemodynamic and coagulation responses to 1-desamino[8-D-arginine]vasopressin (dDAVP) infusion in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *N Engl J Med.* 1988;318:881-887.
116. **Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Gunther G, Rosenthal W, Vischer UM.** Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *J Clin Invest.* 2000;106(1):107-116.
117. **Davies JC, Geddes DM, Alton EW.** Prospects for gene therapy in lung disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1(3):272-7.
118. **Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al.** Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet.* 1994;6(4):335-41.
119. **Strachan T, Read AP.** Gene therapy and other molecular genetic-based therapeutic approaches. In: Strachan T, Read AP, eds. *Human Molecular Genetics*. 2nd ed. New York: Garland Science, a membre of Taylor & Francis Group; 1999:521-535.
120. **Chamberlain JS.** Gene therapy of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2002;11(20):2355-62.
121. **Wakefield PM, Tinsley JM, Wood MJ, Gilbert R, Karpati G, Davies KE.** Prevention of the dystrophic phenotype in dystrophin/utrophin-deficient muscle following adenovirus-mediated transfer of a utrophin minigene. *Gene Ther.* 2000;7(3):201-4.
122. **Rafael JA, Tinsley JM, Potter AC, Deconinck AE, Davies KE.** Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet.* 1998;19(1):79-82.
123. **Vadolas J, Wardan H, Orford M, Williamson R, Ioannou PA.** Cellular genomic reporter assays for screening and evaluation of inducers of fetal hemoglobin. *Hum Mol Genet.* 2004;13(2):223-33.
124. **Lacerra G, Sierakowska H, Carestia C, et al.** Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(17):9591-6.

125. **Strachan T, Read AP.** New approaches to treating disease. In: Strachan T, Read AP, eds. *Human Molecular Genetics*. 3rd ed. New York: Garland Science, a membre of Taylor & Francis Group; 2004:616-626.
126. **Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, et al.** Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1185-93.
127. **Check E.** A tragic setback. *Nature*. 2002;420(6912):116-8.
128. **Check E.** Second cancer case halts gene-therapy trials. *Nature*. 2003;421(6921):305.